



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 382**

51 Int. Cl.:
C12N 9/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03747848 .4**

96 Fecha de presentación : **01.10.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1549745**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.07.2005**

54 Título: **Polipéptidos de la familia GH-61.**

30 Prioridad: **01.10.2002 DK 2002 01459**
22.07.2003 DK 2003 01096

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.05.2011

73 Titular/es: **NOVOZYMES A/S**
Krogshøjvej 36
2880 Bagsværd, DK

72 Inventor/es: **Schnorr, Kirk, Matthew;**
Landvik, Sara;
Spendler, Tina y
Christensen, Lars, Lehmann, Hylling

74 Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 359 382 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

Polipéptidos de la familia GH-61.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al uso de un polipéptido de la familia GH-61 para preparar un producto comestible. La invención también se refiere a polipéptidos GH-61 de polipéptidos que mejoran las propiedades del producto comestible. La invención además se refiere a polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos, a constructos de ácidos nucleicos que comprenden tales polinucleótidos y a vectores de expresión y células huéspedes recombinantes que comprenden tales constructos. La invención también se refiere a procesos para la preparación de dichos polipéptidos y a composiciones que comprenden dichos polipéptidos.

15 **Antecedentes de la invención**

Los carbohidratos y conjugados de glicol son sustratos para glicosil transferasas (GTs) y glicósido hidrolasas (GHs). La estructura de las glicósido hidrolasas empezó a ser descifrada a partir de la década de 1980. Al mismo tiempo, se descubrieron nuevas proteínas de GH y se determinó su secuencia de aminoácidos. Dos observaciones principales surgieron de los nuevos datos. 1) el sistema tradicional de nomenclatura E.C. para nombrar familias de enzimas no era lo suficientemente preciso para clasificar el número creciente de enzimas que tenían una estructura diferente, pero que realizaban la misma reacción enzimática. 2) las enzimas relacionadas por homología podían tener una actividad enzimática diferente, por lo que también el sistema de nomenclatura E.C. resultaba confuso para estas enzimas relacionadas. Bernard Henrissat propuso en 1991 un nuevo sistema de nomenclatura basado en las familias y en la estructura de las enzimas (Henrissat B., A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280:309-316(1991); Henrissat B., Bairoch A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. *Biochem. J.* 293:781-788(1993); Henrissat B., Bairoch A. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* 316:695-696(1996) y Davies g., Henrissat B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure* 3:853-859(1995).). La clasificación en familias de las glicósido hidrolasas según la similitud de la secuencia de aminoácidos se introdujo porque existe una relación directa entre la secuencia y las similitudes de pliegue, y se espera que tal clasificación:

- (i) refleje las características estructurales de las enzimas, que no pueden reflejarse sólo mediante la especificidad de sustrato,
- (ii) ayude a revelar las relaciones evolutivas entre las enzimas, y
- (iii) proporcione una herramienta conveniente para obtener información mecanicista.

Las secuencias de aminoácidos agrupadas según la naturaleza de su similitud con una familia de GH en particular pueden dar una idea en cuanto a la actividad de la hipotética nueva proteína. Posteriormente se ha sugerido que algunas de estas secuencias de aminoácidos, agrupadas en familias de GH por homología tienen cierta actividad enzimática. Así, en resumen, el agrupamiento de una nueva secuencia de aminoácidos en una familia de GH no indica específicamente la actividad enzimática exacta. La actividad enzimática debe ser demostrada mediante un ensayo de actividad de la proteína purificada o clonada. Si el ensayo es difícil, la determinación de la función real de las proteínas puede permanecer sin revelar durante años.

La información disponible públicamente de la familia GH-61 cuenta actualmente con sólo 6 secuencias de nucleótidos de función desconocida. No obstante, un documento divulga una conjetura sobre una de estas secuencias (secuencia SwissProt 014405) que codifica una enzima de endoglucanasa (Saloheimo m., Nakari-Setäläe T., Tenkanen m., Penttiläe M.; (1997) "cDNA cloning of a *Trichoderma reesei* cellulase and demonstration of endoglucanase activity by expression in yeast"; *Eur. J. Biochem.* 249: 584-591(1997)). Un trabajo realizado por el mismo grupo confirmó que la enzima GH61A, una vez purificada, mostraba una actividad de celulasa muy débil. El propio grupo admitió que, ya que la actividad era tres veces de magnitud inferior a las celulasas normales, quizás la celulasa no era el sustrato nativo correcto para la enzima. El grupo también hizo un estudio exhaustivo de la enzima purificada con todos los ensayos de otros carbohidratos conocidos (mananasa, galactanasa etc.) y descubrieron que la enzima no tenía actividad para estos sustratos. Los autores concluyen en su discusión que: "En consecuencia, es poco probable que el hongo produzca Cel61A para su actividad endoglucanasa cuando ya está produciendo endoglucanasas más eficientes... Puede ser que tanto TrCel61A como AbCel61A sean activas contra partes específicas de un sustrato celulósico natural más complejo. Sin embargo, se debe realizar más estudios para descubrir la función de las enzimas glicósido hidrolasas 61" (página 6505).

Actualmente, el sitio web de CAZY (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>) revela una lista de la familia GH-61 no clasificada, lo que significa que propiedades como el mecanismo, nucleófilo catalítico/base, dadores catalíticos de protones, y estructura 3-D no se conocen para las enzimas que pertenecen a esta familia. Aquí la única actividad conocida listada es la actividad de endoglucanasa.

ES 2 359 382 T3

A pesar del examen exhaustivo los bancos de levaduras recombinantes de *Trichoderma reesei* para celulasas y de la recuperación de muchas otras celulasas de otras familias de GH, no hemos identificado específicamente ninguna endoglucanasa de la familia de GH-61 de *Trichoderma reesei* que indique así también que GH61, si dicha familia no incluye celulasas, tiene sólo una actividad muy débil y por tanto no se puede detectar mediante un examen de actividad celulasa recombinante, generalmente muy sensible. Por lo que, las 6 secuencias actuales de nucleótidos descritas públicamente y que pertenecen a la familia GH-61 son o marcos de lectura abiertos desconocidos que comparten homología con la secuencia SwissProt 014405 o secuencias clonadas basadas en la purificación y secuenciación de un gen inducido de celulosa (Isolation and characterization of a cellulose-growth-specific gene from *Agaricus bisporus*, Gene 119:183-190(1992), y además de la proteína Cel61A mencionada anteriormente, la técnica no tiene conocimiento alguno de la función y propiedades de ninguna proteína o péptido que pertenezca a la familia GH-61 ni tampoco se ha descubierto de manera fiable ninguna enzima y/o demostrado su función.

Resumen de la invención

Debido a nuestros esfuerzos en la búsqueda de nuevas carbohidrasas, hemos descubierto ahora por primera vez polipéptidos de la familia GH-61 que proporcionan propiedades mejoradas en productos comestibles, particularmente con un efecto antideterioro en productos comestibles donde el polipéptido maduro comprende SEC ID No.2.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la invención provee un uso del polipéptido GH-61 antideterioro de la invención para preparar un producto comestible.

En otro aspecto, la invención provee un polipéptido GH-61 aislado con un efecto antideterioro en productos comestibles.

En otros aspectos, la invención provee un polinucleótido que codifica el polipéptido de la invención; un constructo de ácidos nucleicos comprendiendo el polinucleótido que codifica el polipéptido, vinculado operativamente a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido hacia un huésped adecuado; un vector de expresión recombinante comprendiendo el constructo de ácidos nucleicos de la invención y una célula huésped recombinante comprendiendo el constructo de ácidos nucleicos de la invención.

En otro aspecto más, la invención provee una composición comprendiendo el polipéptido GH-61 de la invención.

En otros aspectos más, la invención provee métodos para producir un polipéptido GH-61 según la invención que incluye un método que comprende:

- (a) el cultivo de una cepa, la cual, en su forma salvaje es capaz de producir el polipéptido, para producir el polipéptido; y
- (b) la recuperación del polipéptido

y un método que comprende:

- (a) el cultivo de una célula huésped recombinante según la invención en condiciones apropiadas para la producción del polipéptido y
- (b) la recuperación del polipéptido.

En otro aspecto más, la invención provee una planta transgénica comprendiendo una secuencia de nucleótidos de la invención y es capaz de producir el polipéptido GH-61 de la invención.

Breve descripción de los dibujos

Sin dibujos.

Listado de secuencias

La presente solicitud contiene información en forma de listado de secuencias, que acompaña la solicitud y se entregó también en un soporte informático junto con esta solicitud. El contenido del soporte informático se incorpora completamente al presente documento por referencia.

Descripción detallada de la invención*Definiciones*

5 El término “*producto comestible*”, en el contexto de esta invención, se refiere a un producto preparado mediante el calentamiento de una masa, por ejemplo por cocción o al vapor, donde dicho producto es adecuado como producto alimenticio para su consumo por animales, incluyendo el ser humano. En particular el producto comestible es leudado antes de ser calentado. El producto puede tener un aspecto blando o crujiente, ya sea de tipo blanco, claro u oscuro. Unos ejemplos son el pan horneado o al vapor (en concreto pan blanco, integral o de centeno), típicamente en forma de
10 hogazas o roscas, pan de tipo baguette francesa, pan de pita, tortitas, bizcochos, panqueques, galletas, cookies, masas para tartas, pan crujiente, pan al vapor, pizza y similares.

Los términos “*GH*” y “*familia de GH y grupos homólogos*” como se utilizan en este caso, se deben entender como Glicósido Hidrolasas, clasificadas conformemente al bien sistema de clasificación CAZY establecido.

15 El término “*GH-61*”, como se utiliza en este caso, se debe ser entender como una familia de enzimas, que comparten partes de secuencia conservadas comunes y pliegues que se deben clasificar en familia 61 del sistema de clasificación de GH establecido CAZY. En una forma de realización preferida los polipéptidos maduros GH-61 de la invención comparten las siguientes partes conservadas:

20 H en posición 1,
A o P en posición 59,
25 G en posición 60,
G en posición 75,
P o A en posición 76
30 W o F en posición 100,
F o T en posición 101,
35 K o C en posición 102,
Yo o V o L en posición 103,
L o I o V o M en posición 130,
40 P en posición 131,
G, Xaa, Y en posición 137-139
45 L o V o I o M en posición 140
L o V o I o M en posición 141
R en posición 142
50 E o Q en posiciones 143-144,
L o V o I en posición 148
55 H o N en posición 149
C en posición 163 y
60 P, G y P en posición 209-211.

En el presente contexto “*Xaa*” define cualquier aminoácido. También en el presente contexto el sistema de numeración para los residuos se basa en la SEC. ID. NO:2 donde la N-terminal ha sido eliminada de la primera histidina del polipéptido (posteriormente denominada Histidina en posición 1). Este sistema de numeración de residuos se pueden
65 aplicar a otras proteínas GH61 a través de una alineación de secuencia múltiple con la SEC. ID. NO:2 empezando desde dicha primera histidina, sin tener en cuenta los espacios generados por la alineación de secuencia múltiple. La ubicación relativa de la Histidina-1 se determina fácilmente mediante la alineación de secuencia múltiple con la SEC. ID. NO:2. La alineación se debe realizar usando AlignX en el programa informático Vector NTI véase 7.1 (In-

ES 2 359 382 T3

formax Inc., 7600 Wisconsin Avenue, Suite #1100, Bethesda, MD 20814, EEUU). La alineación de aminoácidos se crea usando el algoritmo Clustal W (Nucleic Acid Research, 22 (22): 4673-4680, 1994) y los parámetros adicionales siguientes: Penalización de abertura de espacio de 10, penalización de extensión de espacio de 0,05, gama de penalización de separación de espacio de 8. Los parámetros de alineación por pares eran Ktuple = 1, penalización de espacio = 3, penalización de abertura de longitud de espacio = 10, penalización de extensión de espacio = 0,1, tamaño de ventana = 5 y diagonales = 5.

El término “*secuencia central*”, como se utiliza en este caso, se debe entender como la secuencia del dominio catalítico de polipéptido maduro excluyendo otros dominios funcionales tales como dominios de unión y otros.

El término “*parte conservada*”, como se utiliza en este caso se debe entender como un aminoácido o subsecuencia de aminoácidos contenidos en todos los polipéptidos GH-61 de la invención y así como una característica común de todos estos polipéptidos. El término partes conservadas también se usa para nucleótidos y variantes de éstos, que en virtud de la degeneración del código codifica partes conservadas de aminoácido.

El término “*identidad*”, como se utiliza en este caso, se debe entender como la homología entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos. Para los objetivos de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando AlignX en el programa VECTOR NTI ver. 7.1 (Informax inc., 7600 Wisconsin Avenue Suite #1100, Bethesda, MD 20814, EEUU). La alineación de aminoácidos se crea usando el algoritmo de Clustal W (Nucleic Acid Research, 22 (22): 4673-4680, 1994). La matriz de puntuación de homología usada en el primer caso era blosum62 y en el segundo caso, se utilizó una identidad exacta de las secuencias de aminoácidos en la alineación. Se usaron los siguientes parámetros adicionales: Penalización de abertura de espacio de 10, penalización de extensión de espacio de 0,05, gama de penalización de separación de espacio de 8. Los parámetros de alineación por pares eran Ktuple = 1, penalización de espacio = 3, penalización de abertura de longitud de espacio = 10, penalización de extensión de espacio = 0,1, tamaño de ventana = 5 y diagonales = 5.

El grado de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se puede determinar usando el mismo algoritmo y el paquete software como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, con los siguientes parámetros: Penalización de espacio de 10, y penalización de longitud de espacio de 10. Los parámetros de alineación por pares eran Ktuple=3, penalización de espacio=3 y ventanas=20.

El término “*fragmento*”, como se utiliza en este caso con respecto a un fragmento de un polipéptido de la invención, se debe entender como un polipéptido que tiene uno o más aminoácidos eliminados de la terminal amino y/o carboxilo de la secuencia de aminoácidos del polipéptido, mientras retiene la activación de carbohidrato del polipéptido.

El término “*variante alélica*”, como se utiliza en este caso con respecto a variantes alélicas de un polinucleótido de la invención, se debe entender como cualquiera de las dos o más formas alternativas de un gen que ocupa la misma localización cromosómica. La variación alélica surge naturalmente por mutación, y puede suponer polimorfismo dentro de las poblaciones. Las mutaciones del gen pueden ser silenciosas (ningún cambio en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos alteradas. Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

El término “*modificación(es)*” como se utiliza en este caso con respecto a polipéptidos modificados o polinucleótidos modificados, significa cualquier modificación química del polipéptido, así como la manipulación genética del polinucleótido que codifica el polipéptido. La(s) modificación(es) puede ser sustitución(es) de la cadena(s) lateral(es) de aminoácido, sustitución(es), delección(es) y/o inserciones(s) en o a los aminoácido(s) de interés.

El término “*variante artificial*”, como se utiliza en este caso, se debe entender como un polipéptido modificado capaz de activar carbohidratos, que se ha producido por medio de un organismo que está expresando un gen modificado en comparación con el polinucleótido no modificado que contiene el polipéptido no modificado. El (gen) polinucleótido modificado, donde dicha variante se produce cuando se expresa en un huésped adecuado, se obtiene a través de una intervención humana.

El término “*ADNc*”, como se utiliza en este caso, se destina a designar una molécula de ADN que se puede preparar por transcripción inversa de una molécula de ARNm madura y dividida derivada de una célula eucariota. El ADNc carece de las secuencias de intrón que están presentes normalmente en el ADN genómico correspondiente. La transcripción de ARN primario inicial es un precursor de ARNm y pasa por una serie de etapas de procesamiento antes de aparecer en forma de ARNm maduro y unido. Estas etapas incluyen la eliminación de secuencias de intrón mediante un proceso llamado de empalme. Cuando el ADNc se deriva del ARNm entonces carece de secuencias de intrón.

El término “*construcción de ácido nucleico*”, como se utiliza en este caso, se debe entender como una molécula de ácido nucleico o polinucleótido, simple o bicatenaria, que se aísla de un gen de origen natural o que ha sido modificada para contener segmentos de ácidos nucleicos de modo que no existan en la naturaleza en otra forma. El término constructo de ácidos nucleicos es sinónimo del término “*cassette de expresión*” cuando el constructo de ácido nucleico contiene las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia codificante de la presente invención.

ES 2 359 382 T3

5 El término “*secuencia de control*”, como se utiliza en este caso, se debe entender como una secuencia de nucleótidos que incluye todos los componentes que son necesarios o ventajosos para la expresión de un polipéptido de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa o externa a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Tales secuencias de control incluyen, pero no se limitan a ello, una guía, secuencia de poliadenilación, secuencia de propéptido, promotor, secuencia de péptido señal y terminador de transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor, y señales de parada traduccionales y transcripcionales. Las secuencias de control pueden disponer de enlaces para introducir los sitios específicos de restricción que facilitan la ligadura de las secuencias de control con la región de codificación de la secuencia de nucleótidos que codifican un polipéptido.

10 El término “*unido operativamente*”, como se utiliza en este caso, ha de ser entendida como una configuración en la que una secuencia de control se coloca apropiadamente en una posición en relación con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de modo que la secuencia de control dirige la expresión del polipéptido.

15 El término “*secuencia codificante*”, como se utiliza en este caso, se debe entender como una secuencia de nucleótidos, que especifica directamente la secuencia de aminoácidos del polipéptido. Los límites de la secuencia codificante se determinan generalmente por un marco de lectura abierto, que empieza normalmente con el codón de iniciación ATG. La secuencia codificante incluye típicamente ADN, ADNc, y secuencias de nucleótidos recombinantes.

20 El término “*expresión*”, como se utiliza en este caso, se debe entender como incluyendo cualquier fase ligada a la producción del polipéptido incluyendo, pero sin limitarse a ello, la transcripción, modificación postranscripcional, traducción, postmodificación traduccional, y secreción.

25 El término “*vector de expresión*”, como se utiliza en este caso, se debe entender como una molécula polinucleótida, lineal o circular, comprendiendo un segmento que codifica un polipéptido de la invención, y que se vincula operativamente a segmentos adicionales que proveen su transcripción.

El término “*célula huésped*”, como se utiliza en este caso, incluye cualquier tipo de célula susceptible de transformarse con un constructo de ácidos nucleicos.

30 Los términos, “*sonda de polinucleótidos*”, “*hibridación*”, así como las distintas condiciones de astringencia son definidas a continuación.

Polipéptidos GH-61

35 Los polipéptidos GH-61 según la SEC ID n°. 2 de la invención comparten todas las características descritas anteriormente. Preferiblemente, el polipéptido GH-61 maduro comprende en su forma natural las partes conservadas de

40 una Histidina (H) en posición 1,

A o P en posición 59,

45 G en posición 60,

G en posición 75,

P o A en posición 76,

50 W o F en posición 100,

F o T en posición 101,

55 K o C en posición 102,

Yo o V o L en posición 103,

L o I o V o m en posición 130,

60 P en posición 131,

G, Xaa y Y en posición 137-139

L o V o I o M en posición 140,

65 L o V o I o M en posición 141,

R en posición 142,

ES 2 359 382 T3

E o Q en posiciones 143-144,

L o V o I en posición 148,

5 H o N en posición 149,

C en posición 163 y

10 P y G y P en posición 209-211,

cuando adopta el sistema de numeración mencionado anteriormente.

En particular el polipéptido GH-61 es un polipéptido aislado, lo que significa que una preparación del polipéptido
15 contiene como máximo un 90% en peso de otro material de polipéptido con el que se puede asociar originalmente (se
prefieren porcentajes inferiores de otro material de polipéptido, por ejemplo, como máximo un 80% en peso, como
máximo un 60% en peso, como máximo un 50% en peso, como máximo un 40% como máximo un 30% en peso,
como máximo un 20% en peso, como máximo un 10% en peso, como máximo un 9% en peso, como máximo un
8% en peso, como máximo un 6% en peso, como máximo un 5% en peso, como máximo un 4% como máximo un
20 3% en peso, como máximo un 2% en peso, como máximo un 1% en peso y como máximo un 1/2% en peso). Así, en
particular el polipéptido aislado es al menos 92% puro, es decir, que el polipéptido constituye al menos 92% en peso
del material total de polipéptido presente en la preparación, y se prefieren porcentajes más altos tales como al menos
94% puro, al menos 95% puro, al menos 96% puro, al menos 96% puro, al menos 97% puro, al menos 98% puro,
25 al menos 99%, y como máximo un 99,5% puro. En particular, se prefiere que los polipéptidos descritos aquí estén
en su "forma esencialmente pura", es decir, que la preparación de polipéptido sea esencialmente libre de cualquier
otro material de polipéptido con el que se le asocia originalmente. Esto se puede realizar, por ejemplo, preparando el
polipéptido mediante métodos recombinantes ampliamente conocidos.

El polipéptido GH-61 según la SEC ID No.2 de la invención puede ser hecho sintéticamente, de manera natural
30 o mediante una combinación de éstos. En una forma de realización particular el polipéptido de la invención se puede
obtener a partir de un microorganismo tal como una célula procarionta, una célula arqueal o una célula eucariota. La
célula además se puede modificar por ingeniería genética (cf. fuentes de polipéptidos GH-61, ver a continuación).

En otra forma de realización particular, el polipéptido de la invención tiene un tamaño de aproximadamente 5 kDa
35 a aproximadamente 500 kDa, en particular de aproximadamente 10 kDa a aproximadamente 250 kDa, más particular-
mente de aproximadamente 20 kDa a 100 kDa.

En otra forma de realización más, el polipéptido de la invención puede ser funcionalmente estable a una tempera-
40 tura de hasta 120°C, en particular hasta 1000°C en particular hasta 80°C, más particularmente hasta 60°C.

Los polipéptidos de la invención son como dichos polipéptidos GH-61 según la SEC ID No.2 y tienen un efecto
antideterioro en productos comestibles de la invención. En particular los polipéptidos GH-61 según la SEC ID No.2
tienen un efecto beneficioso con respecto a consistencia, elasticidad y/o movilidad acuática del producto comestible.

De los experimentos destacan los efectos ventajosos en productos comestibles preparados usando los polipéptidos
45 GH-61 según la SEC ID No.2 de la invención. Además, debido a su clasificación en la familia GH-61 se considera
actualmente que el polipéptido GH-61 de la invención es una enzima, en particular una enzima que tiene actividad
de hidrolasa, particularmente una actividad de carbohidrasa. Se concluye también de los experimentos descritos aquí
que los polipéptidos GH-61, según la SEC ID No.2, parecen tener al menos una actividad menor frente al xilano de
50 avena, xilano de madera de abedul y/o arabinóxilano de trigo. Por lo tanto, en una forma de realización particular el
polipéptido GH-61 de la invención muestra al menos una actividad menor frente a estos sustratos.

En otra forma de realización, el polipéptido GH-61 según la SEC ID No.2 de la invención puede mostrar una
55 hidrólisis de sustrato óptima a pH 5-9.

En otra forma de realización más, el polipéptido de la invención puede mostrar una hidrólisis de sustrato óptima
a una temperatura de aproximadamente 10°C a aproximadamente 90°C, tal como aproximadamente 10°C a aproxi-
60 madamente 80°C, particularmente de aproximadamente 20°C a aproximadamente 60°C o aproximadamente 70°C a
aproximadamente 90°C.

En una forma de realización particular, el polipéptido presenta al menos un 20%, en particular al menos un 40%,
tal como al menos un 50%, en particular al menos un 60%, tal como al menos un 70%, más particularmente al
menos un 80%, tal como al menos un 90%, más particularmente al menos un 95%, tales como aproximadamente o
al menos un 100% de la actividad del polipéptido de cualquiera de los polipéptidos que forman las secuencias de
65 aminoácidos mostradas como el polipéptido maduro GH-61 de la SEC ID NO:2. El polipéptido comprende o consiste
en una secuencia de aminoácidos que tiene un grado de identidad con los aminoácidos de los polipéptidos maduros
GH-61 de la SEC ID NO:2, al menos un 80%, como al menos un 85%, incluso más particularmente al menos un
90%, más particularmente al menos un 95%, por ejemplo al menos un 96%, como al menos un 97%, e incluso más

ES 2 359 382 T3

particularmente al menos un 98%, como al menos un 99% (de ahora en adelante “polipéptidos homólogos”), con la condición de que el polipéptido pertenece a la familia de GH-61 y que el polipéptido comprende preferiblemente las partes conservadas de aminoácidos mencionadas anteriormente.

5 En una forma de realización particular, la secuencia de aminoácidos difiere en, como máximo, diez aminoácidos (p. ej. diez aminoácidos), en particular en, como máximo, cinco aminoácidos (p. ej. cinco aminoácidos), tal como en, como máximo, cuatro aminoácidos (p. ej. cuatro aminoácidos), por ejemplo en, como máximo, tres aminoácidos (p. ej. tres aminoácidos) de aminoácidos de los polipéptidos maduros GH-61 de la SEC ID NO:2 teniendo en cuenta la condición mencionada más arriba. En una forma de realización particular, la secuencia de aminoácidos del polipéptido
10 difiere como máximo en dos aminoácidos (p. ej. dos aminoácidos), tales como en un aminoácido de aminoácidos de los polipéptidos maduros GH-61 de la SEC ID NO:2.

Alinear los polipéptidos que consisten en la secuencia de aminoácidos mostrada como aminoácidos de los polipéptidos maduros GH-61 de SEC ID NO:2 con la técnica previa más cercana y usando el método de alineamiento descrito
15 anteriormente (ver la sección titulada “Definiciones”), la secuencia conocida más cercana es Cel61A un *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) endo-1,4-glucanasa IV.

Particularmente, el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos maduros GH-61 de la SEC ID NO:2.
20

En un otra forma de realización particular, el polipéptido consiste en aminoácidos de los polipéptidos maduros GH-61 de la SEC ID NO:2.

El polipéptido de la invención puede ser un polipéptido de tipo salvaje identificado y aislado de una fuente natural.
25

Además, el polipéptido de la invención según la SEC ID No.2 se puede preparar a través de la técnica de redistribución del ADN, tal y como se describe en J.E. Ness *et al.* Nature Biotechnology 17, 893-896 (1999). En particular la variante artificial comprende, particularmente consiste en, una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una sustitución, delección y/o inserción de un aminoácido en comparación con los aminoácidos de los polipéptidos maduros GH-61 de la SEC ID NO:2. En particular la mutación se realiza al exterior de la parte conservada de la secuencia o se puede hacer una sustitución dentro de una parte conservada mientras se mantiene el polipéptido en la familia GH-61. Por ejemplo, para la posición 76 P se puede sustituir por A, mientras se conserve el umbral según la definición.
30

Tales variantes artificiales se pueden construir mediante técnicas estándar conocidas en la técnica, normalmente seguidas de una selección y/o caracterización. Las técnicas estándar incluyen mutagénesis tradicional, por ejemplo por irradiación UV de las células o tratamiento de las células con mutágenos químicos tal como descrito por Gerhardt *et al.* (1994); redistribución de genes *in vivo* tal como descrito en el documento WO 97/07205; redistribución *in vitro* tal como descrito por Stemmer, (1994) o en el documento WO 95/17413, mutagénesis aleatoria tal como descrito por Eisenstadt E. *et al.*, (1994); técnicas RPC tal como descrito por Poulsen *et al.* (1991); redistribución de la familia tal como descrito por J.E. Ness, *et al.*, Biotecnología de naturaleza, vol. 17, págs. 893-896 (1999); mutagénesis dirigida tal como descrito por Sambrook *et al.* (1989), Sambrook *et al.*, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY. Una descripción general de sustitución de nucleótido se puede encontrar por ejemplo en Vado *et al.*, 1991, Protein Expression and Purification 2, págs. 95-107.
40

Tales métodos de ingeniería genética estándar también pueden ser usados para preparar una bibliografía diversificada de secuencias de nucleótidos variantes de los genes que codifican uno o más polipéptidos progenitores, expresando las variantes de polipéptido en una célula huésped adecuada y seleccionando una(s) variante(s) preferida(s). Una bibliografía diversificada se puede establecer mediante una gama de técnicas conocidas para la técnica (Reetz MT; Jaeger KE, en Biocatalysis - from Discovery to Application editado por Fessner WD, vol. 200, págs. 31-57 (1999); Stemmer Nature, vol. 370; págs.389-391, 1994; Zhao y Arnold, Proc. Natl. Acad. Sci., EEUU, vol. 94, págs. 7997-8000, 1997; o Yano *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., EEUU, vol. 95, págs. 5511-5515, 1998).
45

En una forma de realización de la invención, los cambios de aminoácidos (en la variante artificial, al igual que en los polipéptidos de tipo salvaje) son de naturaleza menor, que son sustituciones de aminoácido conservador que no afectan significativamente al pliegue y/o actividad de la proteína; pequeñas delecciones, típicamente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; pequeñas extensiones de terminal amino o carboxilo, tal como un residuo de metionina aminoterminal; un pequeño péptido enlazador de hasta aproximadamente 20-25 residuos; o una pequeña extensión que facilita la purificación mediante el cambio de la carga neta u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión.
55

Ejemplos de sustituciones conservadoras se encuentran en el grupo de aminoácidos básicos (arginina, lisina y histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina, valina y metionina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina y treonina). Sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran ni/o perjudican la función de una proteína se conocen en la técnica y son descritas, por ejemplo, por H. Neurat y R.L. Hill, 1979, In, The Proteins, Academic Press, New York. Los cambios que ocurren por lo general más frecuentemente son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/artesa, Ala/Glu, y Asp/Gly, así como éstos a la inversa.
60

ES 2 359 382 T3

En una forma de realización interesante de la invención, los cambios de aminoácidos son de tal naturaleza que se alteran las propiedades fisicoquímicas de los polipéptidos. Por ejemplo, se pueden realizar cambios de aminoácidos, lo cual mejora la termoestabilidad del polipéptido, que altera la especificidad de sustrato, que cambia el pH óptimo, y similares.

5 Particularmente, el número de estas sustituciones, deleciones y/o inserciones en el polipéptido de la invención, particularmente las de los polipéptidos maduros de SEC ID NO:2, para producir una variante artificial es de un máximo de 10, tales como un máximo de 9, por ejemplo un máximo de 8, más preferiblemente un máximo de 7, por ejemplo un máximo de 6, tal como un máximo de 5, de la forma más preferible un máximo de 4, por ejemplo un máximo de 3,
10 tal como un máximo de 2, en particular un máximo de 1.

En una forma de realización particular, la variante artificial definida arriba es un variante que tiene una inmunogenicidad alterada, preferiblemente reducida, especialmente alergenicidad, en animales incluyendo el hombre en comparación con un polipéptido progenitor. El término “inmunogenicidad” en este contexto se debe entender como
15 la variante artificial que tiene una capacidad alterada, en particular, de unión a los anticuerpos, así como una capacidad alterada para provocar la producción de anticuerpos cuando se administra a un animal, incluyendo, la administración intratraqueal, intravenosa, cutánea, subcutánea y oral.

La administración de la variante artificial puede causar una alteración en los niveles de inmunoglobulinas en el
20 cuerpo animal, tal como en IgE, IgG y IgM o una alteración en el nivel de citoquina en el cuerpo animal. Métodos para el mapeo de epítopos inmunogénicos/antigénicos de una proteína, la preparación de variantes con inmunogenicidad alterada y métodos para medir una respuesta inmunológica son bien conocidos en la técnica y son descritos por ejemplo en WO 92/10755, WO 00/26230, WO 00/26354 y WO 01/31989.

En otra forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos GH-61 con un efecto antideterioro en
25 productos comestibles que se codifican mediante secuencias de nucleótidos que consisten en

- (i) la cadena complementaria de nucleótidos de 52 a 699 de SEC ID NO:1,
- 30 (ii) la cadena complementaria de la secuencia de ADNc contenido en nucleótidos de 52 a 699 de la SEC ID NO:1, (J. Sambrook, E.F. Fritsch, y T. Maniatus, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor, Nueva York).

En particular, el polipéptido de la invención se codifica mediante un polinucleótido comprendiendo la secuencia
35 nucleótida de los nucleótidos 52 a 699 de SEC ID NO:1, o secuencias que difieren del 52 al 699 de SEC ID NO:1, en virtud de la degeneración del código genético. Más particularmente, el polipéptido de la invención se codifica mediante un polinucleótido que consiste en una secuencia nucleótida de los nucleótidos 52 al 699 de SEC ID NO:1 o secuencias que difieren del 52 al 699 de SEC ID NO:1 en virtud a la degeneración del código genético.

Las secuencias de nucleótidos de SEC ID NO:1, así como las secuencias de aminoácidos de SEC
40 ID NO: 2, se pueden utilizar para diseñar una sonda polinucleótida para identificar y clonar ADN que codifique polipéptidos GH-61 de la invención a partir de cepas de diferentes géneros o especies según métodos bien conocidos en la técnica. En particular, tales sondas se pueden usar para la hibridación con el genómico o ADNc del género o especies de interés, siguiendo los procedimientos de transferencia estándar de Southern, para identificar y aislar el gen correspondiente en éstos. Tales sondas pueden ser considerablemente más cortas que la secuencia entera, pero deberían ser de al menos 15 nucleótidos de longitud, preferiblemente de al menos 25, más preferiblemente de al menos 35 nucleótidos de longitud, tales como al menos 70 nucleótidos de longitud. No obstante, se prefiere que la sonda polinucleótida sea de al menos 100 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, la sonda polinucleótida puede ser de al menos 200 nucleótidos de longitud, de al menos 300 nucleótidos de longitud, de al menos 400 nucleótidos de longitud o de al menos 500 nucleótidos de longitud. Incluso se pueden utilizar sondas más largas, por ejemplo, sondas polinucleótidas de al menos 600 nucleótidos de longitud, de al menos 700 nucleótidos de longitud, de al menos 800 nucleótidos de longitud, o de al menos 900 nucleótidos de longitud. Ambas sondas de ADN y ARN pueden ser usadas. Las sondas son designadas típicamente para detectar el gen correspondiente (por ejemplo, con ³²P, ³H, ³⁵S, biotina o avidina).
55

Así, un banco genómico de ADN o de ADNc obtenido a partir de tales otros organismos se puede investigar para determinar el ADN que hibridiza con las sondas descritas anteriormente y que codifica los polipéptidos de la invención. El ADN genómico u otro de tales otros organismos se puede separar mediante electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida, u otras técnicas de separación. El ADN de los bancos de ADN separado puede ser transferido
60 a, e inmovilizado, en nitrocelulosa u otros materiales portadores adecuados. Identificando un clon o ADN que tiene la homología requerida y/o identidad o es homólogo y/o idéntico a los nucleótidos del 52 al 699 de la SEC ID NO:1 el material portador con el ADN inmovilizado se usa en una transferencia de Southern.

Para los objetivos de la presente invención, la hibridación indica que la secuencia nucleótida hibridiza una sonda
65 polinucleótida marcada que hibridiza de nuevo la secuencia nucleótida mostrada en los nucleótidos 52 a 699 de la SEC ID NO:1 en condiciones de astringencia muy baja a muy alta. Las moléculas a las que la sonda polinucleótida hibridiza en estas condiciones se pueden detectar usando película radiográfica o mediante cualquier otro método conocido en la técnica. Siempre que el término “sonda polinucleótida” se use en el presente contexto, se entenderá que tal sonda

ES 2 359 382 T3

contiene al menos 15 nucleótidos. En particular la sonda comprende nucleótidos que codifican partes conservadas de una Histidina (H) en posición 1, A o P en posición 59, G en posición 60, G en posición 75, P o A en posición 76, W o F en posición 100, F o T en posición 101, K o C en posición 102, I o V o L en posición 103, L o I o V o M en posición 130, P en posición 131, G y Xaa y Y en posición 137-139, L o V o I o M en posición 140, L o V o I o M en posición 141, R en posición 142, E o Q en posiciones 143-144, L o V o I en posición 148, H o N en posición 149, C en posición 163 y P y G y P en posición 209-211 en el polipéptido maduro.

En una forma de realización interesante, la sonda polinucleótida es la cadena complementaria de nucleótidos 52 a 300 de la SEC ID NO:1. En otra forma de realización la sonda polinucleótida es la cadena complementaria de nucleótidos 301 a 699 de la SEC ID NO:1.

En otra forma de realización interesante, la sonda polinucleótida es la cadena complementaria de la secuencia nucleótida que codifica el polipéptido de la SEC ID NO:2, o los polipéptidos maduros de la misma. En otra forma de realización interesante, la sonda polinucleótida es la cadena complementaria de la SEC ID NO:1. En otra forma de realización interesante, la sonda polinucleótida es la cadena complementaria de la región de la SEC ID NO:1, que codifica el polipéptido maduro.

Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, se definen unas condiciones de astringencia muy bajas a muy altas como la prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 1.0% SDS, 5X solución de Denhardt, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, siguiendo los procedimientos de transferencia estándar de Southern. Preferiblemente, las sondas largas de al menos 100 nucleótidos no contienen más de 1000 nucleótidos. Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, finalmente el material portador se lava tres veces durante 15 minutos cada vez usando 2 X SSC, 0.1% SDS a 42°C (astringencia muy baja), preferiblemente se lava tres veces durante 15 minutos cada vez usando 0.5 X SSC, 0.1% SDS a 42°C (astringencia baja), más preferiblemente se lava tres veces durante 15 minutos cada vez usando 0.2 X SSC, 0.1% SDS a 42°C (astringencia media), incluso más preferiblemente se lava tres veces durante 15 minutos cada vez usando 0.2 X SSC, 0.1% SDS a 55°C (astringencia media alta), de forma más preferible se lava tres veces durante 15 minutos cada vez usando 0.1 X SSC, 0.1% SDS a 60°C (astringencia alta), en particular se lava tres veces durante 15 minutos cada vez usando 0.1 X SSC, 0.1% SDS a 68°C (astringencia muy alta).

Aunque no se prefiere particularmente, se contempla que sondas más cortas, por ejemplo sondas de aproximadamente de 15 a 99 nucleótidos de longitud, tales como de aproximadamente 15 a aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, pueden ser usadas también. Para este tipo de sondas cortas, las condiciones de astringencia son definidas como prehibridación, hibridación, y lavado posthibridación entre 5°C y 10°C por debajo de la T_m calculada usando el cálculo según Bolton y McCarti (1962, Proceedings of the National Academy of Sciences EEUU 48:1390) en 0,9 M NaCl, 0,09 M tris-HCl pH 7,6, 6 mM EDTA, 0,5% NP-40, 1X solución de Denhardt, 1 mM pirofosfato de sodio, 1 mM fosfato de sodio monobásico, 0,1 mM ATP, y 0,2 mg de levadura ARN por ml siguiendo los procedimientos de transferencia estándar de Southern.

Para sondas cortas de aproximadamente 15 nucleótidos a 99 nucleótidos de longitud, el material portador se lava una vez en 6X SCC más 0.1% SDS durante 15 minutos y dos veces durante 15 minutos cada vez usando 6X SSC a entre 5°C y 10°C por debajo de la T_m calculada.

45 Fuentes de polipéptidos

El polipéptido de la presente invención se puede obtener a partir de microorganismos de cualquier género. Para los objetivos de la presente invención, el término "obtenido a partir de", como se utiliza en este caso, se referirá al hecho de que el polipéptido codificado por la secuencia nucleótida es producido por una célula donde la secuencia nucleótida está presente de forma natural o donde se ha insertado la secuencia nucleótida.

Otros polipéptidos obtenibles a partir de microorganismos son en una forma de realización particular polipéptidos extracelulares, es decir, un polipéptido segregado o de otra manera, exportado por un microorganismo hasta su medio circundante.

Fuentes eucariotas

El polipéptido de la invención se puede obtener a partir de eucariotas particularmente, células vegetales u hongos. Particularmente, el polipéptido puede derivar de hongos que degradan carbohidratos, tales como sustratos celulósicos. Estos hongos incluyen por ejemplo *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Zigomicota* o *Oomicota*. En particular *Verticillium tenerum*, *Coprinus cinerius*, *Diplodia gossipinna*, *Humicola insolens*, *Dichotomocladium hesseltinei*, *Pseudoplectanina nigrella*, *Psilocibe inquilina* y *Trichofaea saccata*.

Otros hongos relevantes pueden ser levaduras tales como una *Candida*, *Kluyveromices*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomices*, o *Yarrowia* o filamentos de hongos tales como un *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Criptococo*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomices*, *Penicillium*, *Piromices*, *Schizofillum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, o *Trichoderma*.

ES 2 359 382 T3

En una forma de realización interesante, el polipéptido deriva de *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis* o *Saccharomyces oviformis*.

5 En otra forma de realización interesante, el polipéptido deriva de *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Fusarium bac-tridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium toru-*
10 *losum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, o *Trichoderma viride*.

Se entenderá que para las especies mencionadas, la invención abarca los estados perfectos e imperfectos, y otros
15 equivalentes taxonómicos, por ejemplo, anamorfos, a pesar del nombre de las especies por el que se les conoce. Expertos en la técnica reconocerán fácilmente la identidad de los equivalentes apropiados.

Las cepas de estas especies son fácilmente accesibles al público en varias colecciones de cultivo, tales como American Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM),
20 Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS), y Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

Además, tales polipéptidos se pueden identificar y obtener a partir de otras fuentes que incluyen microorganismos aislados de la naturaleza (p. ej., tierra, abonos, agua, etc.) usando las sondas mencionadas más arriba. Técnicas para
25 aislar microorganismos de sus hábitats naturales se conocen en la técnica. La secuencia nucleotídica puede derivar luego por medio de un examen similar de una genoteca o banco de ADNc de otro microorganismo. Una vez detectada una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido con la(s) sonda(s), la secuencia se puede aislar o clonar utilizando técnicas conocidas por los expertos en la materia (ver, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

30 Los polipéptidos codificados por secuencias de nucleótidos de la presente invención incluyen también polipéptidos fusionados o polipéptidos escindibles de fusión en los que otro polipéptido se funde en el N-término o el C-término del polipéptido o fragmento del mismo. Un polipéptido fusionado se produce por la fusión de una secuencia de nucleótidos (o una parte de la misma) que codifica otro polipéptido en una secuencia de nucleótidos (o una parte de la misma) de la presente invención. Técnicas para producir polipéptidos de fusión se conocen en el arte, e incluyen la ligación de
35 las secuencias de codificación que codifican los polipéptidos de modo que éstos estén en el marco y que esa expresión del polipéptido fusionado esté bajo control del mismo promotor(es) y terminador.

Secuencias de nucleótidos

40 La presente invención también se refiere a polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos, que codifica un polipéptido GH-61 de la invención. En una forma de realización particular, la secuencia de nucleótidos se establece en la SEC ID NO:1, en una forma de realización más particular, la secuencia de nucleótidos es la región de la SEC ID NO:1, que codifica el polipéptido GH-61 maduro.

45 La presente invención también incluye polinucleótidos que comprenden, particularmente contienen o más particularmente que consisten en, secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:2 o el polipéptido maduro de la misma que incluye secuencias de nucleótidos que difieren de la SEC ID NO:1 en virtud de la degeneración del código genético.

50 La presente invención también se refiere a polinucleótidos que comprenden, preferiblemente que consisten en, una subsecuencia:

55 - que codifica fragmentos de la SEC ID NO:2 que tienen un efecto antideterioro en productos comestibles y contiene las partes conservadas. En particular la subsecuencia es una subsecuencia de la SEC ID NO:1.

La presente invención también se refiere a polinucleótidos que comprenden, preferiblemente que consisten en, una secuencia de nucleótidos modificada comprendiendo al menos una modificación/mutación en el polipéptido maduro
60 que codifica la secuencia de la SEC ID NO:1, y donde la secuencia nucleotídica modificada codifica un polipéptido comprendiendo un H en posición 1, A o P en posición 59, G en posición 60, G en posición 75, P o A en posición 76, W o F en posición 100, F o T en posición 101, K o C en posición 102, I o V o L en posición 103, L o I o V o M en posición 130, P en posición 131, G y Xaa y Y en posición 137-139, L o V o I o M en posición 140, L o V o I o M en posición 141, R en posición 142, E o Q en posiciones 143-144, L o V o I en posición 148, H o N en posición 149, C
65 en posición 163 y P y G y P en posición 209-211.

Las técnicas usadas para aislar y/o clonar una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido se conocen en la técnica e incluyen el aislamiento de ADN genómico, la preparación de ADNc, o una combinación de éstas.

ES 2 359 382 T3

La clonación de las secuencias de nucleótidos de la presente invención de tal ADN genómico se puede efectuar, por ejemplo, usando la famosa reacción en cadena de polimerasa (RCP) o selección de anticuerpos de bancos de expresión para detectar fragmentos de ADN clonados con características estructurales compartidas. Ver, por ejemplo, Innis *et al.*, 1990, PCR: A Guide to Methods and Application, Academic Press, Nueva York. Se pueden utilizar otros procedimientos de amplificación tales como la reacción en cadena de la ligasa (LCR), transcripción activada ligada (LAT) y amplificación basada en secuencias de nucleótidos (NASBA). La secuencia de nucleótidos se puede clonar a partir de una cepa de *Humicola* o *Coprinus*, u otros o de un organismo relacionado y en consecuencia, por ejemplo, puede ser una variante alélica o de especie del polipéptido que codifica la región de la secuencia de nucleótidos.

La secuencia de nucleótidos se puede obtener mediante procedimientos de clonación estándar usados en ingeniería genética para relocalizar la secuencia de nucleótidos de su localización natural en un sitio diferente donde ésta se reproducirá. Los procedimientos de clonación pueden implicar escisión y aislamiento de un fragmento deseado comprendiendo la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido, inserción del fragmento en una molécula de vector, e incorporación del vector recombinante en una célula huésped donde copias múltiples o clones de la secuencia de nucleótidos se replicarán. La secuencia de nucleótidos puede ser genómica, de ADNc, ARN, de origen semisintético sintético, o cualquier combinación de éstos.

La presente invención también se refiere a un polinucleótido que codifica un polipéptido GH-61 de la invención que comprende, preferiblemente que consiste en, una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 80% de identidad, tal como al menos 90% de identidad, más preferiblemente al menos 95% de identidad, tal como al menos 96% de identidad, por ejemplo al menos 97% de identidad, incluso más preferiblemente al menos 98% de identidad, tal como al menos 99% con los nucleótidos 52 a 699 de la SEC ID NO:1 el grado de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina como se describe anteriormente (ver la sección titulada "Definiciones"). Particularmente, la secuencia de nucleótidos comprende nucleótidos 52 a 699 de SEC ID NO:1. En una forma de realización incluso más particular, la secuencia de nucleótidos consiste en nucleótidos 52 a 699 de la SEC ID NO:1.

A los expertos en la técnica les parecerá que tales modificaciones se pueden aplicar para preservar la pertenencia del polipéptido al grupo de homología GH-61 y se pueden aplicar al exterior de las regiones críticas para la función de las regiones de la molécula y seguir obteniendo un polipéptido. Los residuos de aminoácidos esenciales para la función o características de GH-61 del polipéptido codificadas por la secuencia de nucleótidos de la invención, por consiguiente, son preferiblemente no sujetas a modificaciones, tales como la sustitución. Los residuos de aminoácidos esenciales para la función se pueden identificar según procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida o mutagénesis de escaneo de alanina (ver, por ejemplo, Cunningham y Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085). En la última técnica, se introducen mutaciones en cada residuo cargado positivamente en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se evalúan para la función de activación de carbohidrato para identificar los residuos de aminoácidos críticos para la función de la molécula. Los sitios de interacción de polipéptido y carbohidrato también se pueden determinar mediante análisis de la estructura tridimensional como lo determinan las técnicas tales como el análisis de resonancia magnética nuclear, cristalografía o marcación por fotoafinidad (ver, por ejemplo, de Vos *et al.*, 1992, *Science* 255: 306-312; Herrero *et al.*, 1992, *Journal of Molecular Biology* 224: 899-904; Wlodaven *et al.*, 1992, *FEBS Letters* 309: 59-64).

Por otra parte, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención se puede modificar mediante introducción de sustituciones de nucleótido que no dan lugar a otra secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos, pero que corresponden al uso del codón del organismo huésped destinado a producir el polipéptido.

La introducción de una mutación en la secuencia de nucleótidos para intercambiar un nucleótido por otro nucleótido se puede realizar mediante mutagénesis dirigida usando cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. Particularmente útil es el procedimiento que utiliza un vector de ADN superenrollado y bicatenario con un inserto de interés y dos cebadores sintéticos que contienen la mutación deseada. Los cebadores oligonucleótidos, complementarios cada uno con las cadenas opuestas del vector, se extienden durante la variación cíclica de la temperatura mediante *Pfu* ADN polimerasa. Al incorporar los cebadores, se genera un plásmido mutado que contiene cortes en bisel. Después de la variación cíclica de la temperatura, el producto es tratado con DpnI que es específico para el ADN metilado y hemimetilado para digerir el patrón de ADN parental y seleccionar el ADN sintetizado con mutación. Otros procedimientos conocidos en la técnica también pueden ser usados. Para una descripción general de la sustitución del nucleótido, ver, por ejemplo, Vado *et al.*, 1991, *Protein Expression and Purification* 2: 95-107.

La presente invención también se refiere a un polinucleótido que comprende, preferiblemente que consiste en, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido GH-61 que consiste en:

- (i) la cadena complementaria de nucleótidos 52 al 699 de la SEC ID NO:1
- (ii) la cadena complementaria de la secuencia de ADNc contenida en nucleótidos 52 al 699 de la SEC ID NO:1,
- (iii) la cadena complementaria de nucleótidos 52 al 300 de la SEC ID NO:1
- (iv) la cadena complementaria de nucleótidos 301 al 699 de la SEC ID NO:1 (J. Sambrook, E.F. Fritsch, y T. Maniatus, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor, Nueva York).

ES 2 359 382 T3

Constructo de ácidos nucleicos comprendiendo secuencias de nucleótidos

La presente invención también se refiere a constructos de ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de nucleótidos de la invención definidos más arriba y vinculados operativamente a una o más secuencias de control que dirige la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada en condiciones compatibles con las secuencias de control.

Una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la invención se puede manipular de diversas maneras para ofrecer una expresión del polipéptido. La manipulación de la secuencia de nucleótidos antes de su inserción en un vector puede ser necesaria o deseable dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para modificar secuencias de nucleótidos utilizando métodos de ADN recombinante son ampliamente conocidas en la técnica.

La secuencia de control puede ser una secuencia promotora apropiada, una secuencia de nucleótidos reconocida por una célula huésped para la expresión de la secuencia de nucleótidos. La secuencia promotora contiene secuencias de control transcripcionales, que median la expresión del polipéptido. El promotor puede ser cualquier secuencia de nucleótidos que muestre una actividad transcripcional en la célula huésped a elegir, incluyendo promotores mutantes, truncados e híbridos, y se pueden obtener a partir de genes que codifican polipéptidos intracelulares o extracelulares homólogos o bien heterólogos a la célula huésped.

Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácidos nucleicos de la presente invención, especialmente en una célula huésped bacteriana, son los promotores obtenidos a partir del operón *E. coli lac*, el gen de agarasa (*dagA*) de *Streptomyces coelicolor*, el gen de levansucrasa (*sacB*) de *Bacillus subtilis*, el gen de alfa-amilasa (*amyL*) de *Bacillus licheniformis*, el gen de amilasa maltogénica (*amyM*) de *Bacillus stearothermophilus*, el gen de alfa-amilasa (*amyQ*) de *Bacillus amyloliquefaciens*, el gen (*penP*) de penicilinas de *Bacillus licheniformis*, los genes *xylA* y *xylB* de *Bacillus subtilis*, y el gen procariótico de beta-lactamasa (Villa-Kamaroff *et al.*, 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 3727-3731), al igual que el promotor *tac* (DeBoer *et al.*, 1983, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80: 21-25). Más promotores se describen en "Useful proteins from recombinant bacteria" en Scientific American, 1980, 242:74-94; y en Sambrook *et al.*, 1989, *supra*.

Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácidos nucleicos de la presente invención en una célula huésped filamentosa fúngica son promotores obtenidos de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteínasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, alfa-amilasa estable en ácido de *Aspergillus niger*, glucoamilasa (*glaA*) de *Aspergillus niger* o *Aspergillus awamori*, lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*, acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, y proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), así como el promotor NA2-tpi (un híbrido de los promotores de los genes para la alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*); y promotores mutantes, truncados, e híbridos de los mismos.

En un huésped de levadura, se obtienen promotores útiles a partir de los genes para la enolasa (ENO-1) de *Saccharomyces cerevisiae*, galactoquinasa (GAL1) de *Saccharomyces cerevisiae*, alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (ADH2/GAP) de *Saccharomyces cerevisiae*, y 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros promotores útiles para células huéspedes de levadura son descritos por Romanos *et al.*, 1992, Yeast 8: 423-488.

La secuencia de control puede también ser una secuencia de terminación de la transcripción adecuada, una secuencia reconocida por una célula huésped para terminar la transcripción. La secuencia de terminación está vinculada operativamente al término 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Cualquier terminador que sea funcional en la célula huésped elegida puede ser usado en la presente invención.

Terminadores preferidos para células huéspedes filamentosas fúngicas se obtienen a partir de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, sintasa de antranilato de *Aspergillus nidulans*, alfa-glicosidasa de *Aspergillus niger*, y proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.

Terminadores preferidos para células huéspedes de levadura se obtienen a partir de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, citocromo C (CYC1) de *Saccharomyces cerevisiae*, y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros terminadores útiles para células huéspedes de levadura son descritos por Romanos *et al.*, 1992, *supra*.

La secuencia de control puede también ser una secuencia líder adecuada, una región no traducida de un ARNm importante para la traducción por la célula huésped. La secuencia líder está vinculada operativamente al término 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Cualquier secuencia líder funcional en la célula huésped de elección puede ser usada en la presente invención.

Líderes preferidos para células huéspedes filamentosas fúngicas se obtienen a partir de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

ES 2 359 382 T3

Líderes adecuados para células huéspedes de levadura se obtienen a partir de los genes para enolasa (ENO-1) de *Saccharomyces cerevisiae*, 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, y alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (ADH2/GAP) de *Saccharomyces cerevisiae*.

La secuencia de control puede también ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia operativamente vinculada al término 3' de la secuencia de nucleótidos, la cual, cuando se transcribe, es reconocida por la célula huésped como una señal para añadir residuos de poliadenosina al ARNm transcrito. Cualquier secuencia de poliadenilación funcional en la célula huésped elegida puede ser usada en la presente invención.

Secuencias de poliadenilación preferidas para células huéspedes filamentosas fúngicas se obtienen a partir de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*, y alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*.

Secuencias de poliadenilación útiles para células huéspedes de levadura son descritas por Guo y Sherman, 1995, *Molecular Cellular Biology* 15: 5983-5990.

La secuencia de control puede también ser una región codificante de péptido señal que codifica una secuencia de aminoácidos vinculada al término amino de un polipéptido y dirige el polipéptido codificado en la vía secretora de la célula. El extremo 5' de la secuencia codificante de la secuencia de nucleótidos puede contener intrínsecamente una región codificante del péptido señal naturalmente vinculada en el marco de lectura de traducción con el segmento de la región codificante que codifica el polipéptido segregado. Alternativamente, el extremo 5' de la secuencia codificante puede contener una región codificante del péptido señal foráneo a la secuencia codificante. La región foránea codificante del péptido señal puede ser requerida donde la secuencia codificante no contiene naturalmente una región codificante del péptido señal. Alternativamente, la región codificante del péptido señal foráneo puede reemplazar simplemente la región codificante del péptido señal natural para incrementar la secreción del polipéptido. No obstante, cualquier región codificante del péptido señal que dirige el polipéptido expresado en la vía secretora de una célula huésped de elección puede ser usada en la presente invención.

La región codificante del péptido señal consiste en los nucleótidos 1 a 51 de la SEC ID NO:1, que codifica los aminoácidos 18 a 233 de la SEC ID NO:2.

Regiones de codificación del péptido señal eficaces para células huéspedes bacterianas son las regiones codificantes del péptido señal obtenidas a partir de los genes para amilasa maltogénica de *Bacillus* NCIB 11837, alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, subtilisina de *Bacillus licheniformis*, beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis*, proteasas neutras (*nprT*, *nprS*, *nprM*) de *Bacillus stearothermophilus*, y *prsA* de *Bacillus subtilis*. Más péptidos señal son descritos por Simonen y Palva, 1993, *Microbiological Reviews* 57: 109-137.

Regiones codificantes del péptido señal eficaces para células huéspedes filamentosas fúngicas son las regiones codificantes del péptido señal obtenidas a partir de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, amilasa neutra de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, celulasa de *Humicola insolens*, y lipasa de *Humicola lanuginosa*.

Péptidos señal útiles para las células huésped de levadura se pueden obtener a partir de genes de factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* e invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otras regiones codificantes útiles que codifican el péptido señal son descritas por Romanos *et al.*, 1992, *supra*.

La secuencia de control puede ser también una región codificante del propéptido que codifica una secuencia de aminoácidos situada en el término amino de un polipéptido. El polipéptido resultante se puede denominar pro-polipéptido o propolipéptido. Un propolipéptido es generalmente inactivo y se puede convertir en un polipéptido maduro activo por ruptura catalítica o autocatalítica del propéptido del propolipéptido. La región codificante del propéptido se puede obtener a partir de los genes para roteasa alcalina (*aprE*) de *Bacillus subtilis*, proteasa neutra (*nprT*) de *Bacillus subtilis*, factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, y lacasa de *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836).

Cuando ambas regiones del péptido señal y regiones del propéptido están presentes en el término amino de un polipéptido, la región del propéptido se sitúa junto al término amino de un polipéptido y la región del péptido señal se sitúa junto al término amino de la región del propéptido.

En la levadura, se puede utilizar el sistema ADH2 o el sistema GAL1. En hongos filamentosos, el promotor TAKA de alfa-amilasa, promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger*, y promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae* se puede usar como secuencias reguladoras. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son las que permiten la amplificación del gen. En sistemas eucarióticos, éstos incluyen el gen de dihidrofolato-reductasa que se amplifica en presencia de metotrexato, y los genes de metalotioneína que se amplifican con metales pesados. En estos casos, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido se vincularía operativamente a la secuencia reguladora.

ES 2 359 382 T3

Vector de expresión recombinante comprendiendo un constructo de ácidos nucleicos

La presente invención también se refiere a vectores de expresión recombinantes que comprenden el constructo de ácidos nucleicos de la presente invención. Los diferentes ácidos nucleicos y las secuencias de control descritas anteriormente se pueden unir para producir un vector de expresión recombinante, que puede incluir uno o más sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o sustitución de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido en estos sitios. Alternativamente, la secuencia de nucleótidos de la presente invención se puede expresar por inserción de la secuencia de nucleótidos o de un constructo de ácidos nucleicos comprendiendo la secuencia en un vector apropiado para la expresión. Al crear el vector de expresión, la secuencia codificante se localiza en el vector de modo que la secuencia codificante está operativamente vinculada con las secuencias de control apropiadas para la expresión.

El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (p. ej., un plásmido o virus) que puede ser sometido adecuadamente a procedimientos de ADN recombinante y que puede provocar la expresión de la secuencia de nucleótidos. La elección del vector dependerá típicamente de la compatibilidad del vector con la célula huésped en la que se va a introducir el vector. Los vectores pueden ser plásmidos lineales o plásmidos circulares cerrados.

El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma, o un cromosoma artificial.

El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser un vector que, cuando se introduce en la célula huésped, se integra en el genoma y se replica junto con el/los cromosoma(s) en el/los que se ha integrado. Además, se puede utilizar un único vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ADN total para ser introducido en el genoma de la célula huésped, o un transposón.

Los vectores de la presente invención contienen preferiblemente uno o más marcadores seleccionables que permiten la selección fácil de células transformadas. Un marcador seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia biocida o vírica, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos, y similares.

Ejemplos de marcadores seleccionables bacterianos son los genes *dal* de *Bacillus subtilis* o *Bacillus licheniformis*, o marcadores que confieren resistencia antibiótica tal como resistencia a la ampicilina, canamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Marcadores adecuados para células huéspedes de levadura son ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1, y URA3. Marcadores seleccionables para su uso en una célula huésped filamentosa fúngica incluyen, pero sin limitarse a éstos son, *amdS* (acetamidasa), *argB* (omitina carbamoiltransferasa), *bar* (fosfonitrilina acetiltransferasa), *hph* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrito-reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato-d Descarboxilasa), *sC* (sulfato adeniltransferasa), *trpC* (antranilato sintasa), así como equivalentes de éstos.

Los genes preferidos para el uso en una célula de *Aspergillus* son *amdS* y *pyrG* de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y el gen *bar* de *Streptomyces higroscopicus*.

Los vectores de la presente invención contienen preferiblemente un elemento(s) que permite(n) la integración estable del vector en el genoma de la célula huésped o la replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.

Para la integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede depender de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido o cualquier otro elemento del vector para la integración estable del vector en el genoma por recombinación homóloga o recombinación no homóloga. Alternativamente, el vector puede contener secuencias de nucleótidos adicionales para dirigir la integración por recombinación homóloga en el genoma de la célula huésped. Las secuencias de nucleótidos adicionales permiten al vector integrarse en el genoma de la célula huésped en una(s) localización(es) precisa(s) en el/los cromosoma(s). Para aumentar la probabilidad de integración en una localización precisa, los elementos integracionales deben contener preferiblemente un número suficiente de nucleótidos, tal como 100 a 1.500 pares de bases, preferiblemente 400 a 1.500 pares de bases, y de forma más preferible 800 a 1.500 pares de bases, que son altamente homólogas a la correspondiente secuencia objetivo para mejorar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos integracionales pueden ser cualquier secuencia homóloga a la secuencia objetivo en el genoma de la célula huésped. Además, los elementos integracionales pueden ser secuencias de nucleótidos codificantes o secuencias de nucleótidos no codificantes. En cambio, el vector se puede integrar en el genoma de la célula huésped por recombinación no homóloga.

Para la replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación que permite que el vector se replique de manera autónoma en la célula huésped en cuestión. Ejemplos de orígenes bacterianos de replicación son los orígenes de replicación de plásmidos pBR322; pUC19; pACYC177, y pACYC184 que permiten la replicación en *E. coli*, y pUB110; pE194; pTA1060, y pAM β 1 que permiten la replicación en *Bacillus*. Ejemplos de orígenes de replicación para el uso en una célula huésped de levadura son el origen de replicación de 2 micrones, ARS1, ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3, y la combinación de ARS4 y CEN6. El origen de replicación puede ser uno con una mutación que hace que su funcionamiento sea sensible a la temperatura en la célula huésped (ver, por ejemplo, Ehrlich, 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences EEUU 75: 1433).

ES 2 359 382 T3

Se puede insertar más de una copia de una secuencia de nucleótidos de la presente invención en la célula huésped para aumentar la producción del producto genético. Un aumento en el número de copias de la secuencia de nucleótidos se puede obtener integrando al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped o incluyendo un gen marcador seleccionable amplificable en la secuencia de nucleótidos donde las células contienen copias amplificadas del gen marcador seleccionable, y así se puede seleccionar copias adicionales de la secuencia de nucleótidos para cultivar las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

Los procedimientos usados para enlazar los elementos descritos anteriormente para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención son conocidos por los expertos en la materia (ver por ejemplo Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

Célula huésped recombinante comprendiendo un constructo de ácidos nucleicos

La presente invención también se refiere a una célula huésped recombinante comprendiendo el constructo de ácidos nucleicos de la invención, que se usa ventajosamente en la producción recombinante de los polipéptidos. Se introduce un vector comprendiendo una secuencia de nucleótidos de la presente invención en una célula huésped, de modo que el vector se mantenga como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico autoreplicante como se ha descrito anteriormente.

La célula huésped puede ser un microorganismo unicelular, por ejemplo, una procariota o un microorganismo no unicelular, por ejemplo, una eucariota.

Células unicelulares útiles son las células bacterianas tales como bacterias gram positivas incluyendo, pero sin limitarse a éstas, una célula de *Bacillus*, por ejemplo, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, y *Bacillus thuringiensis*; o una célula de *Streptomyces*, por ejemplo, *Streptomyces lividans* o *Streptomyces murinus*, o bacterias gram negativas tales como *E. coli* y especies *Pseudomonas*. En una forma de realización preferida, la célula huésped bacteriana es una célula de *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus*, o de *Bacillus subtilis*. En otra forma de realización preferida, la célula de *Bacillus* es un *Bacillus alcalofílico*. (KKSC/SALK verifican los relevanos para polipéptidos GH-61).

La introducción de un vector en una célula huésped bacteriana se puede realizar, por ejemplo, mediante transformación de protoplastos (ver, por ejemplo, Chang y Cohen, 1979, *Molecular General Genetics* 168: 111-115), usando células competentes (ver, por ejemplo, Young y Spizizin, 1961, *Journal of Bacteriology* 81: 823-829, o Dubnau y Davidoff-Abelson, 1971, *Journal of Molecular Biology* 56: 209-221), electroporación (ver, por ejemplo, Shigekawa y Dower, 1988 *Biotechniques* 6: de 742 751), o conjugación (ver, por ejemplo, Koehler y Thorme, 1987, *Journal of Bacteriology* 169: 5771-5278).

La célula huésped puede ser una eucariota, tal como una célula de mamífero, insecto, planta u hongo.

En una forma de realización preferida, la célula huésped es una célula fúngica. "Fúngico", como se utiliza en este caso, incluye las *phyla Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota*, y *Zygomycota* (como definido por Hawkswort *et al.*, In, Ainsworth Bisby's Dictionary of The Fungi, 8ª edición, 1995, CAB Internacional University Press, Cambridge, Reino Unido), así como la *Oomycota* (como se menciona en Hawkswort *et al.*, 1995, *supra*, pág. 171) y todos los hongos mitospóricos (Hawkswort *et al.*, 1995, *supra*). En una forma de realización preferida, la célula huésped fúngica es una célula de levadura. "Levadura", como se utiliza en este caso, incluye la levadura de *ascosporogenous (Endomycetales)*, levadura de *basidiosporogenous*, y levadura de *Fungi Imperfecti (Blastomycetes)*. Dado que la clasificación de la levadura puede cambiar en el futuro, para los objetivos de esta invención, la levadura se debe definir tal y como se describe en *Biology and Activities of Yeast* (Skinner, F.A., Passmore, S.M., y Davenport, R.R., eds, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series nº. 9, 1980).

En una forma de realización aún más preferida, la célula huésped de levadura es una célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o *Yarrowia*.

En una forma de realización más preferida, la célula huésped de levadura es una célula de *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis* o *Saccharomyces oviformis*. En otra forma de realización más preferida, la célula huésped de levadura es una célula de *Kluyveromyces lactis*. En otra forma de realización más preferida, la célula huésped de levadura es una célula de *Yarrowia lipolytica*.

En otra forma de realización más preferida, la célula huésped fúngica es una célula fúngica filamentosa. "Hongos filamentosos" incluye todas las formas filamentosas de la subdivisión *Eumycota* y *Oomycota* (como definido por Hawkswort *et al.*, 1995, *supra*). Los hongos filamentosos se caracterizan por tener una pared micelial compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano, y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo se realiza por elongación hifal y el catabolismo de carbono es obligatoriamente aeróbico. En cambio, el crecimiento vegetativo por levaduras tales como la *Saccharomyces cerevisiae* se realiza mediante el injerto de un talo unicelular y el catabolismo de carbono puede ser fermentativo.

ES 2 359 382 T3

En una forma de realización aún más preferida, la célula huésped fúngico filamentosa es una célula de una de las especies de, pero no se limita a éstas, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Thielavia*, *Tolipocladium*, o *Trichoderma*.

5 En una forma de realización más preferida, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*. En otra forma de realización más preferida, la célula huésped fúngico filamentosa es una célula de *Fusarium bactridiodi-*
10 *des*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusa-*
15 *rium sambucinum*, *Fusarium sarcochromum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, o *Fusarium venenatum*. En una forma de realización incluso más preferida, la célula madre fúngica filamentosa es una célula de *Fusarium venenatum* (Nirenberg sp. nov.). En otra forma de realización más preferida, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Thielavia terrestris*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, o *Trichoderma viride*.

Las células micóticas se pueden transformar mediante un proceso que implica la formación de protoplasto, transformación de los protoplastos, y regeneración de la pared celular de una manera conocida per se. Procedimientos adecuados para la transformación de células huéspedes de *Aspergillus* se describen en el documento EP 238 023 y
20 Yelton *et al.*, 1984, Proceedings of the National Academy of Sciences EEUU 81: 1470-1474. Métodos adecuados para transformar especies de *Fusarium* son descritos por Malardier *et al.*, 1989, Gene 78: 147-156 y en WO 96/00787. La levadura puede ser transformada usando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, In Abelson, J.N. and Simon, M.I., editors, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, volumen 194, págs 182-187, Academic Press, Inc., Nueva York; Ito *et al.*, 1983, Journal of Bacteriology 153: 163; y Hinnen *et al.*, 1978,
25 Proceedings of the National Academy of Sciences EEUU 75: 1920.

Procesos para preparar polipéptidos funcionales GH-61

30 La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención que comprende (a) el cultivo de una cepa, que en su forma salvaje es capaz de producir el polipéptido; y (b) la recuperación del polipéptido. Preferiblemente, la cepa es un hongo, más preferiblemente un hongo del género de la *Humicola*, particularmente *Humicola insolens* o *Coprinus*, tal como *Coprinus cinereus* o *Thelavia* tal como *Thelavia terrestris*.

35 La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la invención que comprende (a) el cultivo de una célula huésped en condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) la recuperación del polipéptido.

En los métodos de producción de la presente invención, las células se cultivan en un medio nutritivo adecuado
40 para la producción del polipéptido usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula se puede cultivar mediante cultivo en un matraz de agitación, fermentación a pequeña escala o gran escala (incluyendo fermentaciones continuas, lotes, en flujo discontinuo o en estado sólido) en laboratorio o fermentadores industriales realizados en un medio adecuado y en condiciones que permiten expresar y/o aislar el polipéptido. El cultivo se desarrolla en un medio nutritivo adecuado comprendiendo fuentes de nitrógeno y carbono, y sales inorgánicas, usando procedimientos
45 conocidos en la técnica. Medios adecuados se pueden conseguir por medio de proveedores comerciales o se pueden preparar según unas composiciones publicadas (p. ej., en catálogos de la Colección de cultivos de tipo americanos). Si el polipéptido se segrega en el medio nutritivo, el polipéptido se puede recuperar directamente del medio. Si el polipéptido no se segrega, se puede recuperar de lisados celulares.

50 El polipéptido puede ser detectado y/o identificado mediante el uso de métodos conocidos en la técnica y modificaciones de éstos que son específicos para el polipéptido. Estos métodos de detección pueden incluir el uso de anticuerpos específicos, formación de un complejo de polipéptido - carbohidrato, o desaparición de un sustrato de carbohidratos activado, secuenciación y alineación, prueba en métodos de preparación de productos comestibles etc. El polipéptido resultante se puede recuperar mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido
55 puede ser recuperado del medio nutritivo mediante procedimientos convencionales incluyendo, pero sin limitarse a éstos, centrifugado, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación, o precipitación.

Los polipéptidos de la presente invención se pueden purificar mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a éstos, cromatografía (p. ej., intercambio iónico, afinidad, cromatografía
60 que hidrofóbico y de exclusión), procedimientos electroforéticos (p. ej., isoelectroenfoque preparatorio), solubilidad diferencial (p. ej. precipitación de sulfato amónico), SDS-PAGE, o extracción (ver, por ejemplo Protein Purification, J.-C. Janson and Lars Ryden, editors, VCH Publishers, Nueva York, 1989).

65 Plantas transgénicas

La presente invención también se refiere a una planta transgénica, parte de una planta o célula vegetal que se ha transformado con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención para expresar y

ES 2 359 382 T3

producir el polipéptido. En una forma de realización, la planta se puede usar como huésped para la producción del polipéptido en cantidades recuperables. El polipéptido se puede recuperar de la planta o parte de la planta. Alternativamente, la planta o parte de la planta que contiene el polipéptido recombinante se puede utilizar en forma de ingredientes en una composición de masa de mejor calidad. La planta transgénica puede ser dicotiledónea o monocotiledónea. Ejemplos de plantas monocotiledóneas son hierbas, tales como la poa de los prados (*Poa pratense*, Poa), hierba forrajera como la festuca, *lolium*, hierbas de zonas templadas como *Agrostis*, y cereales como, por ejemplo, el trigo, la avena, el centeno, la cebada, el arroz, el sorgo, y el maíz (com).

Ejemplos de plantas dicotiledóneas son el tabaco, las leguminosas como los altramuces, la patata, la remolacha azucarera, el guisante, la alubia y la semilla de soja, y plantas crucíferas (de la familia de *Brassicaceae*) como la coliflor, la semilla de colza, y el organismo modelo estrechamente relacionado *Arabidopsis thaliana*.

Ejemplos de partes de planta son el vástago, el callo, las hojas, la raíz, los frutos, las semillas y los tubérculos. También se consideran como parte de una planta los tejidos de la planta específicos como el cloroplasto, el apoplasto, la mitocondria, la vacuola, las peroxisomas y el citoplasma. Además, cualquier célula vegetal, sea cual sea el origen del tejido, se considera como parte de una planta.

También se incluyen en el campo de la presente invención la progenie de tales plantas, partes de planta y células vegetales.

La planta transgénica o célula vegetal que expresa un polipéptido de la presente invención se puede construir conformemente a métodos conocidos en la técnica. En resumen, la planta o célula vegetal se construye mediante la incorporación de uno o más constructos de expresión codificando un polipéptido de la presente invención en el genoma huésped de la planta y mediante la propagación de la planta modificada o célula vegetal resultante en una planta transgénica o célula vegetal.

De manera adecuada, el constructo de expresión es un constructo de ácidos nucleicos comprendiendo una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención vinculado operativamente con secuencias reguladoras apropiadas y requeridas para la expresión de la secuencia de nucleótidos en la planta o parte de la planta elegida. Además, el constructo de expresión puede comprender un marcador seleccionable útil para identificar las células huéspedes en las que el constructo de expresión se ha integrado y las secuencias de ADN necesarias para la introducción del constructo en la planta en cuestión (esto depende del método de introducción de ADN usado).

La elección de secuencias reguladoras, tales como las secuencias del promotor y del terminador, y opcionalmente secuencias de señal o de tránsito, se determinan basándose, por ejemplo, en cuándo, dónde, y cómo se desea expresar el polipéptido. Por ejemplo, la expresión del gen que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser constitutiva o inducible, o se puede desarrollar, en etapas o ser tisular específica, y el producto genético puede ser dirigido a un tejido específico o parte de la planta, tales como semillas u hojas. Secuencias reguladores son descritos, por ejemplo, por Tague *et al.*, 1988, *Plant Physiology* 86: 506.

Para la expresión constitutiva, se puede utilizar el promotor 35S-CaMV (Franck *et al.*, 1980, *Cell* 21: 285-294). Promotores específicos de un órgano pueden ser, por ejemplo, un promotor de tejidos sumideros de almacenamiento tales como semillas, tubérculos de patata y frutas (Eduardos & Coruzzi, 1990, *Ann. Rev. Genet.* 24: 275-303), o de tejidos sumideros metabólicos tales como meristemas (Ito *et al.*, 1994, *Plant Mol. Biol.* 24: 863-878), un promotor específico de semilla tal como la glutelina, prolamina, globulina, o albúmina de arroz (Wu *et al.*, 1998, *Plant and Cell Physiology* 39: 885-889), un promotor de *Vicia faba* de la legúmina B4 y el gen de proteína de semilla desconocido de *Vicia faba* (Conrad *et al.*, 1998, *Journal of Plant Physiology* 152: 708-711), un promotor de una proteína estructural de aceite de semilla (Chen *et al.*, 1998, *Plant and Cell Physiology* 39: 935-941), el promotor napA de una proteína de almacenamiento de *Brassica napus*, u otro promotor cualquiera específico de semillas conocido en la técnica, p. ej., tal y como se describe en WO 91/14772. Además, el promotor puede ser un promotor específico de la hoja tal como el promotor rbcS de arroz o de tomate (Kozuka *et al.*, 1993, *Plant Physiology* 102 991-1000), el promotor del gen de adenina metiltransferasa del virus de chlorella (Mitra y Higgins, 1994, *Plant Molecular Biology* 26: 85-93), o el promotor *aldP* del gen del arroz (Kagaya *et al.*, 1995, *Molecular and General Genetics* 248: 668-674), o un promotor inducible por herida tal como el promotor pin2 de patata (Xu *et al.*, 1993, *Plant Molecular Biology* 22: 573-588).

También se puede utilizar un elemento intensificador de promotor para conseguir una expresión más alta de la enzima en la planta. Por ejemplo, el elemento intensificador de promotor puede ser un intrón que se coloca entre el promotor y la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención. Por ejemplo, Xu *et al.*, 1993, *supra* describen el uso del primer intrón del gen de actina 1 de arroz para aumentar la expresión.

El gen marcador seleccionable y cualquier otra parte del constructo de expresión puede ser elegido a partir de los que se encuentran disponibles en la técnica.

El constructo de ácido nucleico se incorpora en el genoma de la planta según técnicas convencionales conocidas en la técnica, incluyendo la transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación mediada por virus, microinyección, bombardeo de partícula, transformación biolística, y electroporación (Gassen *et al.*, 1990, *Science* 244: 1293; Potrykus, 1990, *Bio/Technology* 8: 535; Shimamoto *et al.*, 1989, *Nature* 338: 274).

ES 2 359 382 T3

Actualmente, la transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es el método escogido para generar dicotiledóneas transgénicas (para una revisión, ver Hooykas y Schilperoort, 1992, Plant Molecular Biology 19: 15-38). No obstante, esto se puede usar también para transformar monocotiledóneas, aunque generalmente se prefieren otros métodos de transformación para estas plantas. Actualmente, el método escogido para generar monocotiledóneas transgénicas es el bombardeo de partículas (partículas microscópicas de oro o tungsteno revestidas con la transformación de ADN) de callos embrionarios o embriones en desarrollo (Christou, 1992, Plant Journal 2: 275-281; Shimamoto, 1994, Current Opinion Biotechnology 5: 158-162; Vasil *et al.*, 1992, Bio/Technology 10: 667-674). Un método alternativo para transformar monocotiledóneas se basa en la transformación de protoplasto tal y como está descrito por Omirulleh *et al.*, 1993, Molecular Biology 21: 415-428.

Siguiendo la transformación, se seleccionan los transformantes que tienen incorporada la expresión del constructo y se regeneran en plantas enteras según métodos conocidos en la técnica.

La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención comprendiendo (a) el cultivo de una planta transgénica o de una célula vegetal comprendiendo una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención en condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) la recuperación del polipéptido.

20 *Composiciones comprendiendo polipéptidos funcionales GH-61*

En otro aspecto, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden un polipéptido de la presente invención y su preparación, en particular composiciones donde el polipéptido de la invención es el componente más importante de la composición, por ejemplo, una composición monocomponente.

La composición puede comprender además una o más enzimas, en particular carbohidrasas tales como amilasa, glucanasa, polipéptido, galactanasa, mananasa etc. Las enzimas pueden también incluir enzimas tales como aminopeptidasa, carboxipeptidasa, catalasa, quitinasa, cutinasa, ciclodextrina glicosiltransferasa, desoxiribonucleasa, esterasa, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, glucoamilasa, alfa-glucosidasa, beta-glucosidasa, haloperoxidasa, invertasa, lacasa, lipasa, manosidasa, oxidasa, enzimas pectinolítica, peptidoglutaminasa, peroxidasa, fitasa, polifenoloxidase, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa, o polipéptido. En una forma de realización particular la amilasa es una amilasa maltogénica, especialmente una exoamilasa maltogénica tal como exo-alfa-amilasa maltogénica o exo-beta-amilasa maltogénica.

Las composiciones se pueden preparar conforme a métodos conocidos en la técnica y pueden tener cualquier apariencia física en forma de líquido, pasta o sólido. Por ejemplo, la composición de polipéptidos se puede desarrollar usando métodos conocidos en la técnica de desarrollo de enzimas y/o productos farmacéuticos, por ejemplo en gránulos revestidos o no revestidos o microgránulos. El polipéptido a incluir en la composición se puede estabilizar conformemente a métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, por estabilización del polipéptido en la composición mediante la adición de un antioxidante o por reducción del agente para limitar la oxidación o se puede estabilizar el polipéptido mediante la adición de polímeros tales como PVP, PVA, PEG u otros polímeros adecuados conocidos por ser beneficiosos para la estabilidad de polipéptidos en composiciones sólidas o líquidas. Cuando se desarrollan los polipéptidos GH-61 de la invención en forma de granulados o polvo aglomerado, las partículas tienen particularmente una distribución de tamaño de partícula estrecha, con más del 95% (en peso) de las partículas del orden de 25 a 500 μm . Granulados y polvos aglomerados se pueden preparar mediante métodos convencionales, por ejemplo, pulverizando la amilasa sobre un portador en un granulador de lecho de fluido. El portador puede consistir en núcleos de partículas con un tamaño de partícula adecuado. El portador puede ser soluble o insoluble, por ejemplo una sal (tal como NaCl o sulfato de sodio), un azúcar (tal como sacarosa o lactosa), un alcohol de azúcar (tal como sorbitol), almidón, arroz, sémola de maíz, o soja. Por lo tanto la invención también proporciona un gránulo comprendiendo un polipéptido GH-61.

En una forma de realización particular la composición es una composición de masa o un aditivo de mejora de masa comprendiendo un polipéptido GH-61 de la invención.

La masa puede comprender ingredientes de base tales como sémola, harina o almidón tales como sémola de trigo, harina de trigo, harina de maíz, almidón de maíz, sémola de centeno, harina de centeno, harina de avena, sémola de avena, sémola de sorgo, harina de sorgo, harina de arroz, sémola de patata, harina de patata o almidón de patata.

La masa también puede comprender otros ingredientes de masa convencionales, por ejemplo, proteínas, tales como leche en polvo y gluten; huevos (sea huevos enteros, yemas de huevo como claras de huevo); oxidantes tales como ácido ascórbico, bromato de potasio, yodato de potasio, azodicarbonamida (ADA) o persulfato de amonio; aminoácidos tales como L-Cisteína y/o glutamato; azúcares; sales tales como cloruro sódico, acetato de calcio, sulfato de sodio o sulfato de calcio.

La masa puede comprender además grasas (triglicérido) tales como grasa granulada o acortamiento.

La masa o aditivo de mejora de masa puede, sin embargo, comprender otro emulsionante como mono o diglicéridos, ésteres de ácido diacetil tartárico de mono- o diglicéridos, ésteres de azúcares de ácidos grasos, ésteres de poliglicerol

de ácidos grasos, ésteres de ácido láctico de monoglicéridos, ésteres de ácido acético de monoglicéridos, estearatos de polioxi-etileno, o lisolecitina.

La masa o aditivo de mejora de masa puede, sin embargo, comprender otro agente leudante tal como levadura, generalmente *Saccharomices cerevisiae* (levadura de panadería) y/o gasificantes químicos tales como compuestos de bicarbonato usados en la levadura artificial.

La masa o aditivo de mejora de masa puede comprender otras enzimas adicionales. Tales enzimas incluyen una enzima lipolítica, particularmente fosfolipasa, galactolipasa y/o actividad de la lipasa de triglicéridos, por ejemplo tal y como se describe en WO 9953769, WO 0032758, WO 0200852 o WO 2002066622. otras enzimas pueden ser amilasas, glucoamilasa, glucoamilasa de ciclodextrina, proteasa o peptidasa, en particular una exopeptidasa, transglutaminasa, lipasa, celulasa, hemicelulasa, glicosiltransferasa, enzima ramificadora (enzima de ramificación 1,4- α -glucano) u oxidorreductasa. La enzima adicional puede ser de origen mamífero, vegetal o microbiano (bacteriano, de levadura o fúngico). La amilasa puede proceder de un hongo, bacteria o planta. Puede ser una alfa-amilasa maltogénica (EC 3.2.1.133), por ejemplo, de *B. stearothermophilus*, una alfa-amilasa, por ejemplo, de *Bacillus*, particularmente *B. licheniformis* o *B. amyloliquefaciens*, una beta-amilasa, por ejemplo, de una planta (p. ej. soja) o de fuentes microbianas (p. ej. *Bacillus*), una glucoamilasa, por ejemplo de *A. niger*, o una alfa-amilasa fúngica, por ejemplo de *A. oryzae*. La hemicelulasa puede ser una pentosanasa, por ejemplo, una xilanasa que puede ser de origen microbiano, por ejemplo, derivada de una bacteria u hongo, tal como una cepa de *Aspergillus*, en particular de *A. aculeatus*, *A. niger*, *A. awamori*, o *A. tubigenis*, de una cepa de *Trichoderma*, por ejemplo, *T. reesei*, o de una cepa de *Humicola*, por ejemplo *H. insolens*. La proteasa puede ser de *Bacillus*, por ejemplo *B. amyloliquefaciens*. La oxidorreductasa puede ser una glucosa oxidasa, una hexosa oxidasa, una lipoxigenasa, una peroxidasa, o una lacasa.

La masa puede, sin embargo, seguir pareciendo una masa fresca, prehorneada o congelada. Puede también ser una masa laminada.

La cantidad de polipéptido GH-61 en la composición, particularmente la masa, debería ascender hasta entre 0,5-100 mg de polipéptido por kg de sustancia seca en la masa, en particular 0.5-50 mg de polipéptido por kg de sustancia seca, en particular 1-25 mg polipéptido por kg sustancia seca, en particular 1-15 mg polipéptido por kg materia seca en la masa, en particular 2-10 mg/kg.

Considerando que los hallazgos de los polipéptidos GH-61 de la invención tienen un efecto significativo en composiciones de masa, se considera actualmente que, como la suciedad en la ropa contiene muy a menudo también productos alimenticios, también tendrá un efecto en la eliminación de tal suciedad textil en un proceso de lavado. Por lo tanto, en otra forma de realización, la composición de la invención es una composición detergente que, además del polipéptido GH-61 de la invención, comprende un tensioactivo y opcionalmente compuestos seleccionados en el grupo que consiste en mejoradores tales como zeolitas, agentes blanqueadores tales como percarbonato, potenciadores del blanqueado tales como TAED o NOBS, supresores de espuma, fragantes, etc.

En otra forma de realización, la composición de la invención es un cereal que contiene una composición alimentaria que, además del polipéptido, comprende un cereal o producto de grano.

En otra forma de realización, la composición de la invención es una composición fermentable, que además del polipéptido, comprende uno o más nutrientes para un microorganismo.

En otra forma de realización, la composición de la invención es una composición de pasta, que además del polipéptido, comprende pulpa.

50 *Aplicaciones de polipéptidos GH-61 funcionales*

El primer aspecto de la invención se refiere al descubrimiento de que los polipéptidos GH-61 aislados, según la invención definida más arriba, tienen un efecto antideterioro significativo cuando se usa (en cantidades eficaces para proporcionar un efecto antideterioro) para la preparación de productos comestibles y así la invención provee el uso de un polipéptido GH-61 antideterioro para preparar un producto comestible. Este uso puede en particular implicar un método de preparación de un producto comestible comprendiendo el calentamiento de una composición de masa que incluye una cantidad eficaz de polipéptido GH-61 antideterioro; en particular el método comprende el hecho de leudar y calentar una composición de masa. Una cantidad eficaz de polipéptido GH-61 es la cantidad mínima requerida para proporcionar un efecto antideterioro medible en un producto comestible.

Una forma de realización contemplada de los polipéptidos GH-61 de la invención es el uso de cantidades eficaces de polipéptidos GH-61 para la preparación de un cereal que contiene una composición alimentaria comprendiendo la mezcla de una mezcla alimentaria con un polipéptido de la invención.

En otra forma de realización contemplada, cantidades eficaces del polipéptido GH-61 de la invención se pueden aplicar en un proceso de hidrólisis de desechos agrícolas para la producción de combustibles alcohólicos.

ES 2 359 382 T3

En otra forma de realización contemplada, cantidades eficaces del polipéptido GH-61 de la invención se pueden aplicar en un proceso de elaboración donde la presencia de un polipéptido puede mejorar la filtrabilidad del jugo.

5 En otra forma de realización contemplada, cantidades eficaces del polipéptido GH-61 de la invención se pueden aplicar en un proceso para la preparación de fruta o zumos vegetales, donde la presencia de un polipéptido puede mejorar la filtración y aumentar el producto.

10 En otra forma de realización contemplada, cantidades eficaces del polipéptido GH-61 de la invención se pueden aplicar en un proceso de tratamiento de materias lignolósicas y pulpa con un polipéptido.

Descripción del detergente y ejemplos

15 El polipéptido de la invención se puede añadir a y así convertirse en un componente de una composición detergente.

20 La composición detergente de la invención se puede, por ejemplo, desarrollar como una composición de detergente de lavado de ropa a mano o a máquina que incluye una composición de aditivo de lavandería adecuada para el pretratamiento de tejidos manchados y una composición de suavizante añadida para el enjuague, o se desarrolla como una composición detergente para el uso de operaciones de limpieza de superficies duras del hogar en general, o se desarrolla para operaciones de lavado de vajilla a mano o en un lavavajillas.

25 En un aspecto específico, la invención proporciona un aditivo detergente comprendiendo la enzima de la invención. El aditivo detergente, al igual que la composición detergente, puede comprender una o más enzimas tales como una proteasa, una lipasa, una cutinasa, una amilasa, una carbohidrasa, una celulasa, una pectinasa, una mananasa, una arabinasa, una galactanasa, una xilanasa, una oxidasa, por ejemplo, una lacasa y/o una peroxidasa.

30 En general las propiedades de la(s) enzima(s) elegida(s) deberían ser compatibles con el detergente seleccionado, (es decir, de un pH óptimo, compatible con otros ingredientes enzimáticos y no enzimáticos, etc.), y la(s) enzima(s) debería(n) estar presente(s) en cantidades eficaces.

35 Proteasas: proteasas adecuadas incluyen aquellas de origen animal, vegetal o microbiano. Se prefiere el origen microbiano. Mutantes modificados química o genéticamente están incluidos a este respecto. La proteasa puede ser una serina proteasa o una metaloproteasa, preferiblemente una proteasa alcalina microbiana o una proteasa de tipo tripsina. Ejemplos de proteasas alcalinas son subtilisinas, especialmente aquellas derivadas de *Bacillus*, por ejemplo, subtilisina Novo, subtilisina Carlsberg, subtilisina 309, subtilisina 147 y subtilisina 168 (descritas en WO 89/06279). Ejemplos de proteasas de tipo tripsina son la tripsina (p. ej. de origen bovino o porcino) y la proteasa de *Fusarium* descrita en WO 89/06270 y WO 94/25583.

40 Ejemplos de proteasas útiles son las variantes descritas en WO 92/19729, WO 98/20115, WO 98/20116, y WO 98/34946, especialmente las variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 27, 36, 57, 76, 87, 97, 101, 104, 120, 123, 167, 170, 194, 206, 218, 222, 224, 235 y 274.

45 Enzimas proteásicas preferidas comercialmente disponibles incluyen Alcalase[®], Savinase[®], Primase[®], Duralase[®], Esperase[®], y Kannase[®] (Novozymes A/S), Maxatase[®], Maxacal[®], Maxapem[®], Properase[®], Purafect[®], OxP[®] Purafect, FN2[®], y FN3[®] (Genencor International Inc.).

50 Lipasas: lipasas adecuadas incluyen aquellas de origen fúngico o bacteriano. Mutantes modificados química o genéticamente están incluidos a este respecto. Ejemplos de lipasas útiles incluyen lipasas de *Humicola* (sinónimo de *Thermomyces*), por ejemplo de *H. lanuginosa* (*T. Lanuginosus*) como se describe en EP 258 068 y EP 305 216 o de *H. insolens* como se describe en WO 96/13580, una lipasa de *Pseudomonas*, por ejemplo de *P. alcaligenes* o *P. pseudoalcaligenes* (EP 218 272), *P. cepacia* (EP 331 376), *P. stutzeri* (GB 1,372,034), *P. fluorescens*, cepa SD 705 especie *Pseudomonas* (WO 95/06720 y WO 96/27002), *P. wisconsinensis* (WO 96/12012), una lipasa de *Bacillus*, por ejemplo de *B. subtilis* (Dartois *et al.* (1993), *Biochemica et Biophysica Acta*, 1131, 253-360), *B. stearothersophilus* (JP 64/744992) o *B. pumilus* (WO 91/16422).

60 Otros ejemplos son variantes de lipasa tales como las que están descritas en WO 92/05249, WO 94/01541, EP 407 225, EP 260105, WO 95/35381, WO 96/00292, WO 95/30744, WO 94/25578, WO 95/14783, WO 95/22615, WO 97/04079 y WO 97/07202.

Enzimas de lipasa preferidas disponibles comercialmente incluyen LipolaseTM y lipolasa UI-traTM (Novozymes A/S).

65 Amilasas: amilasas adecuadas (alfa y/o beta) incluyen aquellas de origen fúngico o bacteriano. Mutantes modificados química o genéticamente están incluidos a este respecto. Amilasas incluyen, por ejemplo, K-amilasas obtenidas de *Bacillus*, por ejemplo una cepa especial de *B. licheniformis*, descrita más detalladamente en GB 1,296,839.

ES 2 359 382 T3

Ejemplos de amilasas útiles son las variantes descritas en WO 94/02597, WO 94/18314, WO 96/23873, y WO 97/43424, especialmente las variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 15, 23, 105, 106, 124, 128, 133, 154, 156, 181, 188, 190, 197, 202, 208, 209, 243, 264, 304, 305, 391, 408, y 444.

5 Amilasas disponibles comercialmente son DuramylTM, TermamylTM, FungamylTM y BANTM (Novozymes A/S), RapidaseTM y PurastarTM (de Genencor International Inc.).

10 Celulasas: celulasas adecuadas incluyen aquellas de origen fúngico o bacteriano. Mutantes modificados química o genéticamente están incluidos a este respecto. Celulasas adecuadas incluyen celulasas del género de *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, por ejemplo las celulasas fúngicas producidas de *Humicola insolens*, *Myceliophthora thermophila* y *Fusarium oxysporum* descritas en US 4,435,307, US 5,648,263, US 5,691,178, US 5,776,757 y WO 89/09259.

15 Celulasas especialmente adecuadas son las celulasas neutras o alcalinas que tienen beneficios en el cuidado del color. Ejemplos de tales celulasas son las celulasas descritas en EP 0 495 257, EP 0 531 372, WO 96/11262, WO 96/29397, WO 98/08940. otros ejemplos son variantes de celulasas tales como las descritos en WO 94/07998, EP 0 531 315, US 5,457,046, US 5,686,593, US 5,763,254, WO 95/24471, WO 98/12307 y PCT/DK98/00299.

20 Celulasas disponibles comercialmente incluyen Celluzyme[®], y Carezyme[®] (Novozymes), Clazinase[®], y Puradax HA[®] (Genencor International Inc.), y KAC-500(B)[®] (Kao Corporation).

25 Peroxidasas/oxidadas: peroxidasas/oxidadas adecuadas incluyen aquellas de origen vegetal, fúngico o bacteriano. Mutantes modificados química o genéticamente están incluidos a este respecto. Ejemplos de peroxidasas útiles incluyen peroxidasas de *Coprinus*, por ejemplo de *C. cinereus*, y variantes de las mismas como aquellas descritas en WO 93/24618, WO 95/10602, y WO 98/15257.

Peroxidasas disponibles comercialmente incluyen Guardzyme[®] (Novozymes A/S).

30 La(s) enzima(s) detergente(s) se puede incluir en una composición detergente añadiendo aditivos separados que contengan una o más enzimas, o añadiendo un aditivo combinado comprendiendo todas estas enzimas. Un aditivo detergente de la invención, es decir, un aditivo separado o un aditivo combinado, se puede desarrollar por ejemplo en forma de granulados, líquido, compuesto acuoso, etc. Formulaciones de aditivo detergente preferidas son los granulados, en particular granulados no pulverizados, líquidos, en particular líquidos estabilizados, o mezclas.

35 Granulados no pulverizados pueden ser producidos, por ejemplo, tal y como se describe en US 4,106,991 y 4,661,452 y pueden opcionalmente ser revestidos mediante métodos conocidos en la técnica. Ejemplos de materiales de recubrimiento céreo son productos de poli(etileno óxido) (polietilenglicol; PEG) con pesos molares medios de 1000 a 20000 nonilfenoles etoxilados que tienen de 16 a 50 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos etoxilados en los que el alcohol contiene de 12 a 20 átomos de carbono y en los que están presentes 15 a 80 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos; ácidos grasos; y mono, di y triglicéridos de ácidos grasos. Ejemplos de materiales de recubrimiento que forman películas adecuadas para la aplicación mediante técnicas de lecho fluidificado se dan en GB 1483591. Preparaciones enzimáticas líquidas pueden, por ejemplo, ser estabilizadas añadiendo un poliol tal como propilenglicol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico o ácido bórico según métodos establecidos. Enzimas protegidas se pueden preparar según el método descrito en EP 238,216.

45 La composición detergente de la invención puede presentar cualquier forma adecuada, por ejemplo en forma de tableta, pastilla, polvo, gránulo, pasta o líquido. Un detergente líquido puede ser acuoso, conteniendo típicamente hasta un 70% de agua y 0-30% de solvente orgánico, o no acuoso.

50 La composición detergente comprende uno o más tensioactivos, que puede ser no iónico incluyendo semipolar y/o aniónico y/o catiónico y/o zwitteriónico. Los tensioactivos están presentes típicamente en un nivel de 0,1% a 60% en peso.

55 Cuando se incluye en éste, el detergente normalmente contendrá aproximadamente de un 1% a aproximadamente un 40% de tensioactivo aniónico tal como alquilbencenosulfonato lineal, alfa olefin sulfonato, sulfato de alquilo (sulfato de alcohol graso), etoxisulfato de alcohol, alcanosulfonato secundario, éster metílico de ácido graso de alfa-sulfo, ácido alquilo o alquenilsuccínico o jabón.

60 Cuando se incluye en éste, el detergente normalmente contiene aproximadamente de un 0,2% a aproximadamente un 40% de un tensioactivo no iónico tal como alcohol etoxilato, nonilfenol, etoxilato alquilpoliglicósido, óxido de alquildimetilamina, monoetanolamida de ácido graso etoxilado, monoetanolamida de ácido graso, amida de ácido graso de polihidroxi alquilo, o N-acilo N-alquilo derivados de glucosamina ("glucamidas").

65 El detergente puede contener de 0-65% de un constructor detergente o agente complejante tal como zeolita, difosfato, trifosfato, fosfonato, carbonato, citrato, ácido nitrilotriacético, ácido etilendiaminatetraacético, ácido dietilnotriaminopentaacético, ácido alquilo o alquenilsuccínico, silicatos solubles o silicatos estratificados (p. ej. SKS-6 de Hoechst).

ES 2 359 382 T3

El detergente puede comprender uno o más polímeros. Ejemplos son carboximetilcelulosa, poli(vinilpirrolidona), poli (etilenglicol), alcohol (poli)vinílico, poli(N-óxido de vinilpiridina), poli(vinilimidazol), policarboxilatos tales como poliacrilatos, copolímeros de ácido maléico/acrílico y copolímeros de lauril ácido metacrílico/acrílico.

5 El detergente puede contener un sistema blanqueante que puede comprender una fuente de H₂O₂ tal como perborato o percarbonato, que se puede combinar con un activador blanqueante de formación de perácido tal como tetraacetiletilendiamina o nonanoiloxibencenosulfonato. Alternativamente, el sistema blanqueante puede comprender peroxiácidos, por ejemplo, del tipo amida, imida, o sulfona.

10 La(s) enzima(s) de la composición detergente de la invención se puede(n) estabilizar usando agentes convencionales estabilizantes, por ejemplo, un poliol tal como el propilenglicol o el glicerol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico, ácido bórico, o un derivado de ácido bórico, por ejemplo, un éster de borato aromático, o ácido fenilbórico derivado tal como el ácido 4-formilfenilbórico, y la composición puede ser formulada como se describe, por ejemplo, en WO 92/19709 y WO 92/19708.

15 El detergente también puede incluir otros ingredientes convencionales de detergente tales como por ejemplo acondicionadores del tejido incluyendo arcillas, reforzadores de espuma, supresores de espuma, agentes anticorrosivos, agentes de suspensión de suciedad, agentes de antireposición de suciedad, tintes, bactericidas, blanqueadores ópticos, hidrotropos, inhibidores de decoloración o perfumes.

20 Actualmente se contempla que en las composiciones detergentes se pueda añadir cualquier enzima, en particular la enzima de la invención, en una cantidad correspondiente a 0,01-100 mg de proteína enzimática por litro de solución de lavado, preferiblemente de 0,05-5 mg de proteína enzimática por litro de solución de lavado, en particular de 0,1-1 mg de proteína enzimática por litro de solución de lavado.

25 La enzima de la invención adicionalmente se puede incorporar en las formulaciones detergentes descritas en WO 97/07202 que se incorporan como referencia en la presente.

30 Ejemplos

Ejemplo 1

Aislamiento de ADN que codifica polipéptidos GH-61 de Telavia terrestris

35 Micelio de un *T. terrestris* se cultiva en MEX-1 para inducir las proteínas que responden a medios celulósicos complejos. Después de 4 días a 37°C, el micelio se recoge por filtración con papel de filtro Whatman 1 MM. El micelio se congela en nitrógeno líquido y se almacena hasta su uso posterior. El aislamiento de ARN se realiza según el protocolo de Chomczynski y Sacchi, 1987 (*Analytical Biochemistry* 162: 156-159). El kit de aislamiento de ARNm Poly(A) Quik se utiliza para purificar el ARN enriquecido con poli A para la producción de ADNc (Stratagene EEUU). La producción de una genoteca de ADNc se consigue según el kit de construcción de librería de ADNc SMART (Clontech EEUU). ADNcs de cadena doble restringida de SfiI se clonan en el vector Lambda TriplEx y el plásmido que contiene colonias se recupera por escisión de masa según el protocolo SMART.

45 Plásmidos individuales que contienen ADNcs son preparados usando 96 sistemas existentes de preparación de plásmido basada en el sílice tales como Qiagen Qia-turbo 96, (Qiagen corp. EEUU). Una vez que el molde plásmido está preparado, todos los plásmidos se ordenan con el cebador de vector usando métodos de secuenciación y equipamiento convencionales.

50 La identificación de marcadores de secuencia expresada (ESTs) de GH61 se consigue buscando en la base de datos no redundante de proteínas (por ejemplo, SWALL) con un programa tal como BlastP (Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool". *J. Mol. Biol.* 215:403-410. Gish, W. & States, D.J. (1993) "Identification of protein coding regions by database similarity search". *Nature Genet.* 3:266-272. Madden, T.L., Tatusov, R.L. & Zhang, J. (1996) "Applications of network BLAST server" *Meth. Enzymol.* 266:131-141. Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402. Zhang, J. & Madden, T.L. (1997) "PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation". *Genome Res.* 7:649-656.

60 Secuencias con similitudes a las secuencias existentes de familia GH-61 se identifican en base a una matriz de puntuación de probabilidad Blast.

Un clon que contiene la SEC ID nº: 1 fue seleccionado para otros análisis.

65

ES 2 359 382 T3

Ejemplo 2

Construcción de un vector de expresión Aspergillus para secuencias de ADN GH61

5 La SEC ID n°: 3 fue amplificada de la siguiente manera: se usó 1 microlitro de ADNc (aproximadamente 10 nanogramos de ADN) en forma de molde en una reacción PCR con los dos cebadores A y B.

Cebador A: 5'-GCGGAATTCATCATGAGGCCCTTCTCCCTC-3' (SEC ID NO:7)

10 Cebador B: 5'-ATTTGCGGCCGCTTCCCGTCATCCTCTAAGGC-3' (SEQID NO:8)

La SEC ID n°: 1 y 5 se puede amplificar de manera similar usando los cebadores:

15 Para la SEC ID n°: 1:

Cebador A: 5'-GCGGAATTCATGAAGCTCACACCTCGGT-3' (SEC ID NO:9)

20 Cebador B: 5'-ATTTGCGGCCGCGCAGCCAACCAACCTGGAAT-3' (SEC ID NO:10)

Para la SEC ID n°: 5:

25 Cebador A: 5'-GCGGAATTCACAATGAAGGTCTTCGCATAC-3' (SEC ID NO:11)

Cebador B: 5'-ATTTGCGGCCGCGCAGATGCGATGAGCATTTAT-3' (SEC ID NO:12)

30

5 pmoles de cada cebador se usaron en un volumen de reacción de 50 microlitros. La polimerasa de ADN de alta fidelidad Qiagen ProofStart y el tampón se usaron según las instrucciones del fabricante (Qiagen, EEUU). En resumen, la reacción se colocó en un variador térmico (MJ Research, Diad, EEUU) y ésta fue ciclada en las siguientes condiciones de reacción: Una desnaturalización inicial de 5 minutos a 95 grados Celsius, 25 ciclos como indicado a continuación: 94 grados-30 segundos, 55 grados-30 segundos, 72 grados 2 minutos. Una temperatura de extensión final de 72 grados durante 10 minutos fue usada después. Se separaron alícuotas de la reacción PCR en un 1% de gel de agarosa. Se determinó una banda distinta: el tamaño de esta banda (1.1 kb) correspondía bien al tamaño previsto del marco de lectura abierto.

40

El fragmento fue digerido con EcoRI y NotI que se acortan en las preponderancias introducidas por los cebadores de la PCR. Los fragmentos digeridos fueron aislados y clonados en pMStr54, un plásmido de expresión de Aspergillus basado en el plásmido pCaHj527 (ver los ejemplos de solicitud de patente internacional WO 00/70064) construido tal y como se describe en el ejemplo 7 de WO 02/12472. El ADN plasmídico fue aislado de las colonias del experimento de clonación. Las colonias se ordenaron en secuencias con cebadores de vector PNA21 (5'-GTT TCC AAC ATC ATT TAC CTC-3') y MHas5NotI (5'-TTG CCC ATC TCC CCA TCC TTT-3') que se ceban en direcciones opuestas en el inserto de plásmido. Se determinó que no se producía ningún error en ninguna de las secuencias de inserto como resultado de la PCR.

50

Ejemplo 3

Expresión de la SEC ID N°: 1 en Aspergillus

55 SEC ID N°: 1 se transformó en cepa JAL355 de *Aspergillus oryzae* (descrita en la solicitud de patente internacional WO 01/98484A1). Transformantes de la SEC ID N°: 1 fueron reaislados dos veces en condiciones selectivas y no inductoras en placas mínimas Cove con 1 M de sacarosa como fuente de carbono y 10mM de nitrato (ver receta del fabricante). Para evaluar la expresión de la SEC ID N°: 1, 3 y 5, los transformantes fueron cultivados durante 3 y 4 días a 30 grados Celsius en tubos con 10 ml YPM (2% peptona, 1% extracto de levadura, 2% maltosa). Los sobrenadantes se obtuvieron con NuPage 10% Bis-tris SDS gels (Invitrogen) según las recomendaciones del fabricante. Todos los *Aspergillus* aislados crecieron adecuadamente incluso cuando eran inducidos por la expresión de SEC ID N°: 1.

65

ES 2 359 382 T3

Ejemplo 4

Purificación de SEC ID N°: 2 de expresión de SEC ID N°: 1 en Aspergillus

5 Un sobrenadante del cultivo de una fermentación de la cepa de *Aspergillus oryzae* de expresión de la SEC ID n°: 1 se filtró a través de un filtro de 0.22 μm para eliminar los micelios. 350 ml del filtrado sobrenadante se diluyeron en 1450 ml de agua y a un pH fijado a 7.5 dando como resultado una conductividad de 1.8 mS/cm. Esta solución fue cargada en una columna de intercambio aniónico de 50 ml Q-Sefarosa equilibrada con 25 mM Tris pH 7.5. La columna fue lavada con aproximadamente 15 volúmenes de columna de 25 mM Tris pH 7.5 y las proteínas enlazadas
10 fueron eluidas con un gradiente de NaCl en aumento lineal de 0 a 0,5 M en 20 volúmenes de columna. A partir de la SDS-PAGE se determinó que un polipéptido con un peso molecular de aproximadamente 29 kDa era eluido durante el lavado con 25 mM Tris, pH 7.5. Fracciones que contienen el polipéptido de 29 kDa fueron depositadas y concentradas en un dispositivo de ultrafiltración de Amicon con un 6 kDa filtro de corte (Dow, GR 81 PP). El depósito concentrado tenía una pureza de al menos un 95% tal como estimado por la SDS-PAGE y la secuenciación N-terminal
15 del polipéptido produjo la secuencia correspondiente a la SEC ID n°: 2 (HiTFPQTDINGQLSGE).

Ejemplo 8

Actividad de prueba de SEC ID N°: 2

Se preparó una suspensión con sustrato de xilano de avena AZCL, xilano de madera de abedul AZCL y arabinoxilano AZCL mediante la suspensión de 2 miligramos por mililitro del sustrato en un tampón NaP, pH 7 conteniendo 0.0225% p/p Brij.

25 La actividad de la SEC ID NOS 2 purificada fue evaluada mediante la mezcla de una suspensión de sustrato de 500 microlitros con 100 microlitros de una solución que contenía las SEC ID NOS 2, 4 o 6 aisladas. Esta mezcla fue incubada a 37°C, donde, después de sedimentar el sustrato no digerido por centrifugado y evaluar el sustrato digerido por medición de la absorbencia del sobrenadante a 590 nanómetros. Se restó un vacío determinado por sustitución de
30 una muestra de la solución de la enzima por un tampón de las mediciones de absorbancia.

Resultados

Polipéptido GH-61	Absorbencia para xilano de avena AZCL	Absorbencia de xilano de madera de abedul AZCL	Absorbencia de arabinoxilano de trigo AZCL
SEC ID n°: 2	0,0172	0,1077	0,1296

Estos resultados indican que los polipéptidos GH-61 tienen al menos una actividad menor contra estos sustratos.

Ejemplo 9

Prueba de efecto de la SEC ID N°: 2 en calidad de pan horneado

El pan fue horneado con 2 kg de harina según el método de esponja Sponge & Dough. Se añadió propionato de Ca a la receta. El método de esponja Sponge & Dough es un método estándar reconocido muy conocido por el experto en la materia, ver por ejemplo Bread & Bread Making; Mauri Integrated Ingredient, 10a Edición, noviembre 1995, capítulo 3.3.

Las enzimas se dosificaron según la tabla siguiente:

	1	2	3	4	5	6	7	8
Novamyl MANU/kg	400	400	400	400	400	400	400	400
Shearzyme FXU/kg								200
<i>T. terrestris</i> SEQ ID NO:2 mg/kg				1	2	5		

65 El pan fue envasado en bolsas de plástico y almacenado a temperatura ambiente hasta su análisis. La textura y la RMN fueron medidas los días 7, 14 y 21 y una pequeña evaluación sensorial fue realizada el día 21.

ES 2 359 382 T3

Mediciones de textura

Datos de consistencia y elasticidad se muestran en las tablas 1 y 2.

TABLA 1

Cambio de la consistencia durante el almacenamiento

Consistencia (g)			
Día	7	14	21
400 MANU/kg Novamyl	379	531	784
400 MANU/kg Novamyl + 1 mg/kg SEC ID NO: 2	442	642	871
400 MANU/kg Novamyl + 2 mg/kg SEC ID NO: 2	405	539	618
400 MANU/kg Novamyl + 5 mg/kg SEC ID NO: 2	434	530	788
400 MANU/kg Novamyl	461	580	671
400 MANU/kg Novamyl + 200 FXU/kg Shearzyme	518	773	986

TABLA 2

Cambio de la elasticidad durante el almacenamiento

Elasticidad % (g/g)			
Día	7	14	21
400 MANU/kg Novamyl	52,8	49,9	47,9
400 MANU/kg Novamyl + 1 mg/kg SEC ID NO: 2	52,7	48,0	46,9
400 MANU/kg Novamyl + 2 mg/kg SEC ID NO: 2	51,9	48,8	48,5
400 MANU/kg Novamyl + 5 mg/kg SEC ID NO: 2	51,9	49,5	47,0
400 MANU/kg Novamyl	52,6	49,2	48,8
400 MANU/kg Novamyl + 200 FXU/kg Shearzyme	51,1	46,5	44,8

Los polipéptidos GH 61 muestran resultados prometedores en comparación con la combinación de derivación = Novamyl + Shearzyme. Especialmente la SEC ID NO:2 en combinación con Novamyl muestra un efecto antideterioro en la blandura y elasticidad comparable a, o mejor que con Novamyl solo.

Características del agua

La cantidad y movilidad del agua fue medida por RMN. La cantidad y movilidad del agua libre, que se considera correlacionada con la sensación de humedad del pan, se muestra en la tabla 3.

ES 2 359 382 T3

TABLA 3

Cambio de la movilidad de agua con el tiempo (RMN)

Movilidad del agua libre (μs)			
Día	7	14	21
400 MANU/kg Novamyl	7398	6801	6015
400 MANU/kg Novamyl + 1 mg/kg SEC ID NO: 2	7116	6617	6035
400 MANU/kg Novamyl + 2 mg/kg SEC ID NO: 2	7552	7047	6221
400 MANU/kg Novamyl + 5 mg/kg SEC ID NO: 2	7360	6942	6077
400 MANU/kg Novamyl	7582	7067	6227
400 MANU/kg Novamyl + 200 FXU/kg Shearzyme	7359	6686	6039

Las dos referencias de Novamyl muestran resultados muy diferentes en la medición de movilidad de agua mediante RMN. Las “mejores” referencias de Novamyl muestran un efecto comparable a la SEC ID NO:2 en combinación con Novamyl, no obstante la segunda referencia de Novamyl muestra resultados significativamente inferiores a éstos.

Evaluación sensorial

Una evaluación sensorial fue llevada a cabo por un equipo de expertos en la técnica de cocción del pan. El pan con el polipéptido GH61 de la SEC ID NO:2 en combinación con Novamyl fue seleccionado como el mejor en cuanto a la percepción de humedad y blandura. Esta evaluación sensorial se correlaciona con la migración del agua libre (medida por RMN), que se puede relacionar con la humedad.

Conclusión

Los polipéptidos GH-61 según la SEC ID NO:2 - muestran un efecto antideterioro significativo y mejoran la calidad del pan preparado con el uso de los polipéptidos. En particular se mejora el mantenimiento de la frescura del pan, particularmente de la blandura, la elasticidad, la percepción de la humedad y la capacidad de retención de la humedad.

También la combinación de polipéptidos GH-61 con, por ejemplo, Novamyl, que es una exoamilasa maltogénica, muestra mejoras en la blandura de pan, medida mediante un análisis de textura y al mismo tiempo la elasticidad se mantuvo más o menos en comparación con el Novamyl solo.

ES 2 359 382 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polipéptido GH-61 comprendiendo una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad con los aminoácidos del polipéptido maduro de la SEC ID NO:2.
2. Polipéptido según la reivindicación 1 que consiste en los aminoácidos de los polipéptidos maduros de SEC ID NO:2.
- 10 3. Polipéptido según la reivindicación 1 comprendiendo al menos una sustitución, delección o inserción al exterior de las partes conservadas de la secuencia de aminoácidos.
4. Polipéptido según la reivindicación 1 comprendiendo al menos una sustitución al interior de las partes conservadas.
- 15 5. Polipéptido según la reivindicación 3, donde el número de sustituciones, delecciones o inserciones es al máximo de 10.
6. Polipéptido según la reivindicación 1 codificado por un polinucleótido comprendiendo la secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 52 a 699 de la SEC ID NO:1, o secuencias que difieren de 52 a 699 de la SEC ID NO:1, en virtud de la degeneración del código genético.
- 20 7. Polipéptido según la reivindicación 6 codificado por un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 52 a 699 de la SEC ID NO:1, o secuencias que difieren de 52 a 699 de la SEC ID NO:1 en virtud de la degeneración del código genético.
- 25 8. Polinucleótido comprendiendo una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 30 9. Polinucleótido según la reivindicación 8 comprendiendo una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:2 o los polipéptidos maduros de la misma.
10. Polinucleótido según la reivindicación 9 que consiste en la región de SEC ID NO:1, que codifica el polipéptido maduro.
- 35 11. Polinucleótido según la reivindicación 8 comprendiendo una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 80% de identidad con los nucleótidos 52 a 699 de SEC ID NO:1.
- 40 12. Constructo de ácidos nucleicos comprendiendo una secuencia de nucleótidos según las reivindicaciones 8 a 11 vinculada a una o más secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada en condiciones compatibles con las secuencias de control.
13. Vector de expresión recombinante comprendiendo el constructo de ácidos nucleicos definido en la reivindicación 12.
- 45 14. Célula huésped recombinante comprendiendo el constructo de ácidos nucleicos según la reivindicación 12.
15. Método para la producción de un polipéptido según las reivindicaciones 1 a 7 comprendiendo:
- 50 (a) el cultivo de una célula huésped recombinante tal como se define en la reivindicación 14 en condiciones adecuadas para la producción del polipéptido; y
- (b) la recuperación del polipéptido.

55

60

65

ES 2 359 382 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Novozymes A/S

5 <120> GH-61 xilanasas

<130> 10274/Novozymes

10 <160> 12

<170> patentIn version 3.1

15 <210> 1

<211> 699

<212> ADN

20 <213> T. terrestris

<220>

<221> si_peptide

25 <222> (1)..(51)

<223>

<220>

30 <221> mat_peptide

<222> (52)..()

<223>

35 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(699)

40 <223>

45

50

55

60

65

ES 2 359 382 T3

<400> 1

5	atg aag ctc acc acc tcg gtc gcc ctg ctt gcc gcg gcg ggc gcg cca Met Lys Leu Thr Thr Ser Val Ala Leu Leu Ala Ala Ala Gly Ala Gln	48
	-15 -10 -3	
10	gcc cac tac acc ttc ccg cag acg gac atc aac ggc cag ctc tcc ggc Ala His Tyr Thr Phe Pro Gln Thr Asp Ile Asn Gly Gln Leu Ser Gly	96
	-1 1 5 10 15	
15	gaa tgg gtg acg atc cgt gag acg acp aac cac tac tcg cac ggc ccg Glu Trp Val Thr Ile Arg Glu Thr Thr Asn His Tyr Ser His Gly Pro	144
	20 25 30	
20	gtc acc gac gtc acg tcg gac cag atc gcc tgc tac gag ctc aac ccg Val Thr Asp Val Thr Ser Asp Gln Ile Arg Cys Tyr Glu Leu Asn Pro	192
	35 40 45	
25	ggc acc ccc gcg ccc cag atc gcc acg gtg cag gcc ggc ggc acc gtg Gly Thr Pro Ala Pro Gln Ile Ala Thr Val Gln Ala Gly Gly Thr Val	240
	50 55 60	
30	acc ttc acc gtc gac cca agc atc cag cac ccg ggc ccg ctg cag ttc Thr Phe Thr Val Asp Pro Ser Ile Gln His Pro Gly Pro Leu Gln Phe	288
	65 70 75	
35	tac atg gcc aag gcg ccg tcg ggc cag acc gcc gcc acc ttc cag ggc Tyr Met Ala Lys Ala Pro Ser Gly Gln Thr Ala Ala Thr Phe Gln Gly	336
	80 85 90 95	
40	acc ggc aac gtc tgg ttc aag atc tac gag gac ggc ccg tcc ggc ctc Thr Gly Asn Val Trp Phe Lys Ile Tyr Glu Asp Gly Pro Ser Gly Leu	384
	100 105 110	
45	ggc acc agc aac atc acc tgg cct agc agc ggc aaa acc gaa gtc agc Gly Thr Ser Asn Ile Thr Trp Pro Ser Ser Gly Lys Thr Glu Val Ser	432
	115 120 125	
50	gtc aag atc ccc tcg tgc atc gcg ccg ggc gac tac ctc ctg cgc gtg Val Lys Ile Pro Ser Cys Ile Ala Pro Gly Asp Tyr Leu Leu Arg Val	480
	130 135 140	
55	gag cac atc gcg ctg cac agc gcc agc acc gtc ggc ggc gcc cag ttc Glu His Ile Ala Leu His Ser Ala Ser Thr Val Gly Gly Ala Gln Phe	528
	145 150 155	
60	tac ctc gcg tgc gcc cag ctg acc gtc acc gcc ggc acc gcc acc ctc Tyr Leu Ala Cys Ala Gln Leu Thr Val Thr Gly Gly Thr Gly Thr Leu	576
	160 165 170 175	
65	aac acp ggc gag ctc gtc gcc ttc ccc gcc gcc tac agc gcc acc gac Asn Thr Gly Glu Leu Val Ala Phe Pro Gly Ala Tyr Ser Ala Thr Asp	624
	180 185 190	
70	ccg ggc atc ctc ttc cag ctg tac tgg ccc atc ccg acc agc tac acc Pro Gly Ile Leu Phe Gln Leu Tyr Trp Pro Ile Pro Thr Ser Tyr Thr	672
	195 200 205	
75	aac ccc ggc ccg gcg ccc gtt agc tgc Asn Pro Gly Pro Ala Pro Val Ser Cys	699
	210 215	

<210> 2

60 <211> 233

<212> PRT

<213> *T. terrestris*

65

ES 2 359 382 T3

<400> 2

5 Met Lys Leu Thr Thr Ser Val Ala Leu Leu Ala Ala Ala Gly Ala Gln
-15 -10 -5

10 Ala His Tyr Thr Phe Pro Gln Thr Asp Ile Asn Gly Gln Leu Ser Gly
-1 1 5 10 15

15 Glu Trp Val Thr Ile Arg Glu Thr Thr Asn His Tyr Ser His Gly Pro
20 25 30

20 Val Thr Asp Val Thr Ser Asp Gln Ile Arg Cys Tyr Glu Leu Asn Pro
35 40 45

25 Gly Thr Pro Ala Pro Gln Ile Ala Thr Val Gln Ala Gly Gly Thr Val
50 55 60

30 Thr Phe Thr Val Asp Pro Ser Ile Gln His Pro Gly Pro Leu Gln Phe
65 70 75

35 Tyr Met Ala Lys Ala Pro Ser Gly Gln Thr Ala Ala Thr Phe Gln Gly
80 85 90 95

40 Thr Gly Asn Val Trp Phe Lys Ile Tyr Glu Asp Gly Pro Ser Gly Leu
100 105 110

45 Gly Thr Ser Asn Ile Thr Trp Pro Ser Ser Gly Lys Thr Glu Val Ser
115 120 125

50 Val Lys Ile Pro Ser Cys Ile Ala Pro Gly Asp Tyr Leu Leu Arg Val
130 135 140

55 Glu His Ile Ala Leu His Ser Ala Ser Thr Val Gly Gly Ala Gln Phe
145 150 155

60 Tyr Leu Ala Cys Ala Gln Leu Thr Val Thr Gly Gly Thr Gly Thr Leu
160 165 170 175

65 Asn Thr Gly Glu Leu Val Ala Phe Pro Gly Ala Tyr Ser Ala Thr Asp
180 185 190

70 Pro Gly Ile Leu Phe Gln Leu Tyr Trp Pro Ile Pro Thr Ser Tyr Thr
195 200 205

75 Asn Pro Gly Pro Ala Pro Val Ser Cys
210 215

<210> 3

<211> 957

<212> ADN

60 <213> *Humicola insolens*

<220>

<221> CDS

65 <222> (1)..(957)

<223>

ES 2 359 382 T3

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(45)
 5 <223>

 <220>
 <221> mat_peptide
 10 <222> (46)..()
 <223>

 <220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (858)..(957)
 <223> CBM1 domain
 20 <400> 3

25	atg agg ccc ttc tcc ctc gtc gcc ctg ccg acg gcc gtc agc ggc cac	48
	Met Arg Pro Phe Ser Leu Val Ala Leu Ala Thr Ala Val Ser Gly His	
	-13 -10 -5 -1 1	
30	gcc atc ttc cag cgc gtg tcg gtt aac ggt gtc gac caa ggc cag ctc	96
	Ala Ile Phe Gln Arg Val Ser Val Asn Gly Val Asp Gln Gly Gln Leu	
	5 10 15	
35	aag ggc gtg cgg gct ccc tcg agc aac tac cct att gag aac gtc aac	144
	Lys Gly Val Arg Ala Pro Ser Ser Asn Tyr Pro Ile Glu Asn Val Asn	
	20 25 30	
40	cac ccc gac ttt gcc tgc aac acc aac atc cgg cac cgc gac ggc acc	192
	His Pro Asp Phe Ala Cys Asn Thr Asn Ile Arg His Arg Asp Gly Thr	
	35 40 45	

ES 2 359 382 T3

	gtc atc aag atc ccc gcc gcc gcc acc gtc gcc gcc tgg tgg cag cac	240
	Val Ile Lys Ile Pro Ala Gly Ala Thr Val Gly Ala Trp Trp Gln His	50 55 60 65
5	gag atc gcc ggg ccc tcg ttc ccc ggt gat ccg gat aac ccg atc gct	288
	Glu Ile Gly Gly Pro Ser Phe Pro Gly Asp Pro Asp Asn Pro Ile Ala	70 75 80
10	gcc tcg cac aag gcc ccc atc caa gtc tat ctc gcc aag gtc gac aac	336
	Ala Ser His Lys Gly Pro Ile Gln Val Tyr Leu Ala Lys Val Asp Asn	85 90 95
15	gcc gct acc gcc tct ccc aac gcc ctg ccg tgg ttc aag att gcc gag	384
	Ala Ala Thr Ala Ser Pro Asn Gly Leu Arg Trp Phe Lys Ile Ala Glu	100 105 110
20	aag gcc ctg tcg gcc gcc gtc tgg gcc gtc gac gag atg atc ccg aac	432
	Lys Gly Leu Ser Gly Gly Val Trp Ala Val Asp Glu Met Ile Arg Asn	115 120 125
25	aac gcc tgg cac tac ttc acc atg ccg cag tgc atc gcc ccc gcc cac	480
	Asn Gly Trp His Tyr Phe Thr Met Pro Gln Cys Ile Ala Pro Gly His	130 135 140 145
30	tac ctg atg gcc gtc gag ctg ctg gcc ctg cac tcg gcc agc ttc ccc	528
	Tyr Leu Met Arg Val Glu Leu Leu Ala Leu His Ser Ala Ser Phe Pro	150 155 160
35	gcc gcc gcc cag ttc tac atg gag tgc gcc cag atc gag gtc acc gcc	576
	Gly Gly Ala Gln Phe Tyr Met Glu Cys Ala Gln Ile Glu Val Thr Gly	165 170 175
40	tcg gcc aac ttc tcg ccc tcc gag acc gtc agc ttc ccc gcc gcc tac	624
	Ser Gly Asn Phe Ser Pro Ser Glu Thr Val Ser Phe Pro Gly Ala Tyr	180 185 190
45	ccg gcc aac cac ccg ggt atc gtc gtc agc atc tac gac gcc cag ggt	672
	Pro Ala Asn His Pro Gly Ile Val Val Ser Ile Tyr Asp Ala Gln Gly	195 200 205
50	aac gcc aac aac gcc ggg ccg gag tac cag atc ccc ggg ccg cgg ccg	720
	Asn Ala Asn Asn Gly Gly Arg Glu Tyr Gln Ile Pro Gly Pro Arg Pro	210 215 220 225
55	atc acc tgc tcc gcc ggt gga agc aac aat ggt gcc ggg aac aac aat	768
	Ile Thr Cys Ser Gly Gly Gly Ser Asn Asn Gly Gly Gly Asn Asn Asn	230 235 240
60	ggt ggt gga aac aat aac gcc gcc gcc gcc aac aac aac ggc ggt ggg	816
	Gly Gly Gly Asn Asn Asn Gly Gly Gly Gly Asn Asn Asn Gly Gly Gly	245 250 255
65	aac aac aac ggt gcc ggt aac acc ggt gcc gcc tcg ccg ccg ctc tgg	864
	Asn Asn Asn Gly Gly Gly Asn Thr Gly Gly Gly Ser Ala Pro Leu Trp	260 265 270
70	ggc cag tgc gcc gcc aat ggg tat tcc gcc ccg acg act tgc gcc gag	912
	Gly Gln Cys Gly Gly Asn Gly Tyr Ser Gly Pro Thr Thr Cys Ala Glu	275 280 285
75	ggt act tgc aag aag cag aat gac tgg tac tcg cag tgt acc cct	957
	Gly Thr Cys Lys Lys Gln Asn Asp Trp Tyr Ser Gln Cys Thr Pro	290 295 300

<210> 4

<211> 319

<212> PRT

<213> *Humicola insolens*

65

ES 2 359 382 T3

<400> 4

5 Met Arg Pro Phe Ser Leu Val Ala Leu Ala Thr Ala Val ser Gly His
 -15 -10 -5 -1 1

10 Ala Ile Phe Gln Arg Val Ser Val Asn Gly Val Asp Gln Gly Gln Leu
 5 10 15

15 Lys Gly Val Arg Ala Pro Ser Ser Asn Tyr Pro Ile Glu Asn Val Asn
 20 25 30

20 His Pro Asp Phe Ala Cys Asn Thr Asn Ile Arg His Arg Asp Gly Thr
 35 40 45

25 Val Ile Lys Ile Pro Ala Gly Ala Thr Val Gly Ala Trp Trp Gln His
 50 55 60 65

30 Glu Ile Gly Gly Pro Ser Phe Pro Gly Asp Pro Asp Asn Pro Ile Ala
 70 75 80

35 Ala Ser His Lys Gly Pro Ile Gln Val Tyr Leu Ala Lys Val Asp Asn
 85 90 95

40 Ala Ala Thr Ala Ser Pro Asn Gly Leu Arg Trp Phe Lys Ile Ala Glu
 100 105 110

45 Lys Gly Leu Ser Gly Gly Val Trp Ala Val Asp Glu Met Ile Arg Asn
 115 120 125

50 Asn Gly Trp His Tyr Phe Thr Met Pro Gln Cys Ile Ala Pro Gly His
 130 135 140 145

55 Tyr Leu Met Arg Val Glu Leu Leu Ala Leu His Ser Ala Ser Phe Pro
 150 155 160

60 Gly Gly Ala Gln Phe Tyr Met Glu Cys Ala Gln Ile Glu Val Thr Gly
 165 170 175

65 Ser Gly Asn Phe Ser Pro Ser Glu Thr Val Ser Phe Pro Gly Ala Tyr
 180 185 190

70 Pro Ala Asn His Pro Gly Ile Val Val Ser Ile Tyr Asp Ala Gln Gly
 195 200 205

75 Asn Ala Asn Asn Gly Gly Arg Glu Tyr Gln Ile Pro Gly Pro Arg Pro
 210 215 220 225

80 Ile Thr Cys Ser Gly Gly Gly Ser Asn Asn Gly Gly Gly Asn Asn Asn
 230 235 240

ES 2 359 382 T3

<400> 5

5 atg aag gtc ttc gca tac gtc gcc ctc ctc gcc gcc gct gcc cag tcg 48
 Met Lys Val Phe Ala Tyr Val Ala Leu Leu Ala Ala Ala Ala Gln Ser
 -15 -10 -5

10 gct tct gct cac tac atc tgg acc acc ctc acc gcc gcc gcc cag acc 96
 Ala Ser Ala His Tyr Ile Trp Thr Thr Leu Thr Ala Gly Gly Gln Thr
 -1 1 5 10

15 acc tcc gcc gtc atc cgc cag ccc ctc aac aac tcc ccc gtc gag gac 144
 Thr Ser Ala Val Ile Arg Gln Pro Leu Asn Asn Ser Pro Val Glu Asp
 15 20 25

20 gtc tcc tcc ccc cac atg cgc tgc aac gtc aac ccc atp ccc gcc tcg 192
 Val Ser Ser Pro His Met Arg Cys Asn Val Asn Pro Met Pro Ala Ser
 30 35 40 45

25 cag acc ctc aac gtt cag gcc gcc tcc agc gtc acc ttc cgc ctc gac 240
 Gln Thr Leu Asn Val Gln Ala Gly Ser Ser Val Thr Phe Arg Leu Asp
 50 55 60

30 aac acc ctc tac cac ccc gcc ccc gcc gcc atc tac ctc gcc caa gtc 288
 Asn Thr Leu Tyr His Pro Gly Pro Ala Ala Ile Tyr Leu Gly Gln Val
 65 70 75

35 ccc gcc gcc cag acc gcc gcc tct tgg gac gga agc ggt gct aac tgg 336
 Pro Ala Gly Gln Thr Ala Ala Ser Trp Asp Gly Ser Gly Ala Asn Trp
 80 85 90

40 ttc aag atc gac gag ttc gcc gcc cag ttc aac ccc ttc cgc ttc atc 384
 Phe Lys Ile Asp Glu Phe Gly Ala Gln Phe Asn Pro Phe Arg Phe Ile
 95 100 105

45 ccc gac gcc cag agc cag ctc tcc acc acc atc ccc tcc aac act ccc 432
 Pro Asp Gly Gln Ser Ser Gln Leu Ser Thr Thr Ile Pro Ser Asn Thr Pro
 110 115 120 125

50 agc gcc gag tac ctc ctc cgc atc gag cac atc ggt ctc cac gtc gcc 480
 Ser Gly Glu Tyr Leu Leu Arg Ile Glu His Ile Gly Leu His Val Ala
 130 135 140

55 gcc gct ccc caa tac tac atc tcc tgc gcc caa atc cgc gtt aat gcc 528
 Gly Ala Pro Gln Tyr Tyr Ile Ser Cys Ala Gln Ile Arg Val Asn Gly
 145 150 155

60 ggt gga gcc gcc aac cca ccc aag gtc tcc atc ccc gga tac gtc tcg 576
 Gly Gly Gly Gly Asn Pro Pro Lys Val Ser Ile Pro Gly Tyr Val Ser
 160 165 170

65 agg aac gac ccc ggt ctc acc gtc aac atc cac tgg ccc atc ccc acc 624
 Arg Asn Asp Pro Gly Leu Thr Val Asn Ile His Trp Pro Ile Pro Thr
 175 180 185

70 tcc tac acc gtc ccc gga ccc cgc ccc tgg agg gga 660
 Ser Tyr Thr Val Pro Gly Pro Arg Pro Trp Arg Gly
 190 195 200

<210> 6

60 <211> 220

<212> PRT

<213> *Coprinus cinereus*

65

ES 2 359 382 T3

<400> 6

5 Met Lys Val Phe Ala Tyr Val Ala Leu Leu Ala Ala Ala Ala Gln Ser
-15 -10 -5

10 Ala Ser Ala His Tyr Ile Trp Thr Thr Leu Thr Ala Gly Gly Gln Thr
-1 1 5 10

15 Thr Ser Ala Val Ile Arg Gln Pro Leu Asn Asn Ser Pro Val Glu Asp
15 20 25

20 Val Ser Ser Pro His Met Arg Cys Asn Val Asn Pro Met Pro Ala Ser
30 35 40 45

25 Gln Thr Leu Asn Val Gln Ala Gly Ser Ser Val Thr Phe Arg Leu Asp
50 55 60

30 Asn Thr Leu Tyr His Pro Gly Pro Ala Ala Ile Tyr Leu Gly Gln Val
65 70 75

35 Pro Ala Gly Gln Thr Ala Ala Ser Trp Asp Gly Ser Gly Ala Asn Trp
80 85 90

40 Phe Lys Ile Asp Glu Phe Gly Ala Gln Phe Asn Pro Phe Arg Phe Ile
95 100 105

45 Pro Asp Gly Gln Ser Gln Leu Ser Thr Thr Ile Pro Ser Asn Thr Pro
110 115 120 125

50 Ser Gly Glu Tyr Leu Leu Arg Ile Glu His Ile Gly Leu His Val Ala
130 135 140

55 Gly Ala Pro Gln Tyr Tyr Ile Ser Cys Ala Gln Ile Arg Val Asn Gly
145 150 155

60 Gly Gly Gly Gly Asn Pro Pro Lys Val Ser Ile Pro Gly Tyr Val Ser
160 165 170

65 Arg Asn Asp Pro Gly Leu Thr Val Asn Ile His Trp Pro Ile Pro Thr
175 180 185

70 Ser Tyr Thr Val Pro Gly Pro Arg Pro Trp Arg Gly
190 195 200

<210> 7

60 <211> 30

<212> ADN

<213> Cebador A para la SEC ID n°: 3

65 <400> 7

gcggaattca tcatgaggcc cttctccctc

ES 2 359 382 T3

	<210> 8	
	<211> 32	
	<212> ADN	
5	<213> Cebador B para la SEC ID nº: 3	
	<400> 8	
	atttgcggcc gcttcccgtc atcctctaag gc	32
10		
	<210> 9	
	<211> 29	
	<212> ADN	
15	<213> Cebador A para la SEC ID nº: 1	
	<400> 9	
20	gcggaattca tgaagctcac cacctcgg	29
	<210> 10	
	<211> 32	
25	<212> ADN	
	<213> Cebador B para la SEC ID nº: 1	
	<400> 10	
30	atttgcggcc ccaacctgga de gcgcagccaa en	32
	<210> 11	
35	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Cebador A para la SEC ID nº: 5	
40	<400> 11	
	gcggaattca caatgaaggt cttgcatac	30
45		
	<210> 12	
	<211> 32	
	<212> ADN	
50	<213> Cebador B para la SEC ID nº: 5	
	<400> 12	
55	atttgcggcc gcacgatgcg atgagcattt en	32
60		
65		