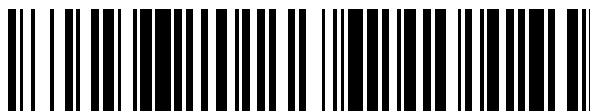


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 753**

51 Int. Cl.:

C12N 9/36 (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01)
A61Q 11/00 (2006.01)
C12N 15/56 (2006.01)
A61K 38/47 (2006.01)
C11D 3/386 (2006.01)
A23K 1/165 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.02.2005 E 05700649 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.12.2014 EP 1718742**

54 Título: **Enzima de degradación de la pared celular fúngica**

30 Prioridad:

25.02.2004 DK 200400300

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

18.03.2015

73 Titular/es:

**NOVOZYMES A/S (100.0%)
KROGSHÖJVEJ 36
2880 BAGSVAERD, DK**

72 Inventor/es:

**WU, WENPING y
SCHNORR, KIRK, MATTHEW**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 531 753 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

Enzima de degradación de la pared celular fúngica

5 Campo de invención

[0001] La presente invención se refiere a una enzima fúngica con actividad de lisozima, una secuencia de nucleótidos que codifica la lisozima, un constructo de ácidos nucleicos que comprende la secuencia de nucleótidos, métodos de producción de la lisozima, al igual que los usos de la lisozima.

10

Antecedentes de la invención

15

[0002] La lisozima es una O-glicosil hidrolasa producida como un mecanismo de defensa contra las bacterias por muchos organismos. La enzima causa la hidrólisis de las paredes celulares bacterianas por escisión de los enlaces glicosídicos de peptidoglicano, una molécula estructural importante en las bacterias. Después de tener sus paredes celulares debilitadas por la acción de la lisozima, las células bacterianas se alisan como resultado de la presión osmótica.

20

[0003] La lisozima se produce en muchos organismos tales como los virus, las plantas, los insectos, los pájaros, los reptiles y los mamíferos. En mamíferos, la lisozima se ha aislado a partir de secreciones nasales, saliva, lágrimas, intestinos, orina y leche. La enzima escinde el enlace glicosídico entre número de carbono 1 de ácido N-acetilmurámico y número de carbono 4 de N-acetil-D-glucosamina. *In vivo*, estos dos carbohidratos se polimerizan para formar el polisacárido de la pared celular.

25

[0004] La purificación y las propiedades de las enzimas líticas a partir de filtrados de cultivo crudos de *Chalaropsis* fue publicada por J.J.H. Hash (1963), Archives Biochem. Biophys. 102, 379-388 y fue purificada por J.H. Hash y M.V. Rothlauf (1967), J. Biol. Chem. 242:23, 5586-5590. La secuencia de la lisozima Ch de *Chalaropsis* se ha descrito en Felch *et al.* (1975), J. Biol. Chem. 250(10), págs. 3713-3720. Bacterias contra las que la lisozima ha mostrado eficacia incluyen *Clostridium butyricum*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Listeria monocytogenes*.

30

[0005] La acción lítica de la proteína de lisozima de la clara de huevo se está aprovechando actualmente en dos mercados.

35

[0006] En la producción de queso, se ha descubierto que la lisozima es eficazmente destructiva en las formas vegetativas de bacterias de *Clostridia* y específicamente *Clostridium tyrobutyricum*. Se ha descubierto que estas bacterias sobreviven al tratamiento térmico normal de la leche usado en la producción de queso y más tarde se propagan para provocar un hinchamiento tardío. El hinchamiento tardío es la formación de gases durante la fermentación butírica que se producen durante la maduración del queso. Los efectos de la formación de gases indeseados pueden ser: fallos en la textura a través del desarrollo de ojos con formas irregulares o gustos y olores indeseables obvios y, finalmente, el bloque de queso se puede romper completamente. Con el uso de lisozima en el cultivo de leche, la producción y el curado del queso se puede realizar sin preocuparse por la fermentación butírica que causa los efectos de hinchamiento tardío. Esto ha llevado al amplio uso de la lisozima en la producción de queso europeo, particularmente en la producción de queso semicurado y curado. La dosificación recomendada es de 0,2 lbs/1.000 galones de leche (que corresponde a aproximadamente 24 g/1.000 litros de leche). La lisozima se debe añadir después del tratamiento térmico debido a la inestabilidad térmica y lo antes posible antes de añadir el cuajo debido a la sensibilidad de la proteasa.

40

45

50

[0007] En farmacología, la función natural de la lisozima en los líquidos biológicos es atacar las bacterias extrañas al cuerpo. Muchas bacterias que invaden el cuerpo a través de cualquier vía típica como los ojos, la boca, la nariz y las heridas son combatidas con el sistema inmunológico humano, del que la lisozima es una parte crítica. Esta actividad anti-infecciosa se ha explotado en la industria farmacológica mediante la producción de comprimidos y cápsulas farmacéuticas que contienen esta proteína derivada de la clara de huevo. También es un componente importante en las gotas para los ojos, la pasta dental y pastillas para la garganta. Los usos potenciales para la lisozima son variados. Se han determinado resultados satisfactorios en la investigación del cáncer y en aplicaciones veterinarias. Como conservante alimenticio, la lisozima es una alternativa orgánica natural para muchos carcinógenos potenciales. El uso de la lisozima en las aplicaciones de alimento para bebés así como en el pienso para animales ha mostrado resultados positivos. El potencial para esta enzima derivada de la clara de huevo es diverso e la investigación y el desarrollo en aplicaciones futuras está en marcha.

60

[0008] Se ha informado de una lisozima GH25 de *Chalaropsis* (Felsch JW, Ingagami T y Hash JH. (1975) The N,O-Diacetylmuramidase of Chalaropsis species; V The complete amino acid sequence. JBC. 250:10 pp 3713-3720).

65

[0009] La lisozima de clara de huevo de gallina que es el producto primario disponible en el mercado comercial, no escinde N,6-O-diacetylmuramidasa en, por ejemplo, las paredes celulares de *Streptococcus aureus* y así es incapaz de lisar este importante patógeno humano entre otros.

[0010] Por lo tanto se desean nuevos polipéptidos que tengan actividad de lisozima.

Resumen de la invención

[0011] Los inventores de la presente invención han aislado un gen/ADNc fúngico que codifica una enzima que tiene actividad de lisozima. Tal gen/ADNc que codifica la enzima no se ha descrito previamente, que nosotros sepamos.

[0012] En un primer aspecto, la presente invención por lo tanto se refiere a un polipéptido fúngico que tiene actividad de lisozima y que pertenece a la familia GH25 seleccionada del grupo que consistente en:

(a) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos, que tiene al menos 80% de identidad con los aminoácidos 1 a 233 de SEC ID n°: 2;

(b) un polipéptido que es codificado por una secuencia de nucleótidos que hibridiza bajo condiciones de astringencia altas con una sonda polinucleótida que consiste en la cadena complementaria de los nucleótidos 84 a 782 de SEC ID n°: 1; o

(c) un fragmento de (a) o (b) que tiene actividad de lisozima; donde el polipéptido tiene un pH óptimo en pH 5.

[0013] En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la invención. La presente invención se refiere además a métodos para producir polipéptidos de la invención y al uso de polipéptidos de la invención como un inhibidor de la formación de biopelícula, en una composición dental, en una composición de detergente o en el pienso para animales.

Definiciones

[0014] Antes de discutir las formas de realización detalladas de la invención, se proporciona una definición de los términos específicos relacionada con los aspectos principales de la invención.

[0015] Abreviaturas: GlcNAc, N-acetilglucosamina; MurNAc, ácido N-acetilmurámico.

[0016] Polipéptido sustancialmente puro: en el presente contexto, el término "polipéptido sustancialmente puro" se refiere a una preparación de polipéptido que contiene a lo sumo 10% en peso de otro material de polipéptido con el cual está originalmente asociado (porcentajes inferiores de otro material de polipéptido se prefieren, por ejemplo a lo sumo 8% en peso, a lo sumo 6% en peso, a lo sumo 5% en peso, a lo sumo 4%, a lo sumo 3% en peso, a lo sumo 2% en peso, a lo sumo 1% en peso, y a lo sumo ½% en peso). Así, se prefiere que el polipéptido sustancialmente puro sea al menos 92% puro, es decir que el polipéptido constituya al menos 92% en peso del material de polipéptido total 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, al menos 99% puro y al menos 99,5% puro. Los polipéptidos que se describen aquí están preferiblemente en una forma sustancialmente pura. En particular, se prefiere que los polipéptidos que se describen aquí estén en "forma esencialmente pura", es decir, que la preparación de polipéptido esté esencialmente libre de otro material de polipéptido con el cual esté originalmente asociado. Esto se puede conseguir, por ejemplo, preparando el polipéptido mediante métodos recombinantes bien conocidos. Aquí, el término "polipéptido sustancialmente puro" es sinónimo de los términos "polipéptido aislado" y "polipéptido en forma aislada".

[0017] Actividad de lisozima: el término actividad de lisozima se define aquí como una O-glicosil hidrolasa, que cataliza la hidrólisis del enlace glicosídico entre dos o más carbohidratos, o entre un carbohidrato y una fracción no carbohidrato. Las lisozimas escinden el enlace glicosídico entre ciertos residuos en mucopolisacáridos y mucopéptidos de paredes celulares bacterianas, dando como resultado la bacteriólisis. La lisozima pertenece a la clase enzimática EC 3.2.1.17.

[0018] Identidad: en el presente contexto, la homología entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos es descrita por el parámetro "identidad".

[0019] Para fines de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina por una alineación de Needleman-Wunsch, útil tanto para alineaciones de proteína y de ADN. Para alineaciones de proteína, la matriz de puntuación por defecto usada es BLOSUM50, y la penalización para el primer residuo en un espacio es -12, mientras que la penalización para residuos adicionales en un espacio es -2.

La alineación se puede hacer con el programa informático Align del paquete FASTA versión v20u6 (W. R. Pearson y D. J. Lipman (1988), "Improved Tools for Biological Sequence Analysis", PNAS 85: 2444-2448; y W. R. Pearson (1990) "Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA", Methods in Enzymology, 183:63-98).

[0020] El grado de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se puede determinar usando el mismo algoritmo y paquete de software que el descrito anteriormente utilizando la matriz de identidad como la matriz de puntuación por

defecto. La penalización para el primer residuo en un espacio es -16, mientras la penalización para residuos adicionales en un espacio es -4.

[0021] Fragmento: cuando se usa aquí, un "fragmento" de SEC ID n°: 2 es un polipéptido que mantiene su actividad de lisozima pero que tiene uno o más aminoácidos eliminados del amino y/o carboxilo terminal de esta secuencia de aminoácidos. Preferiblemente, un fragmento contiene a lo sumo 208 residuos de aminoácidos, por ejemplo, de los aminoácidos 20 a 228 de SEC ID n°: 2.

[0022] Polinucleótido sustancialmente puro: el término "polinucleótido sustancialmente puro" como se utiliza en este caso se refiere a una preparación polinucleótida, donde el polinucleótido se ha retirado de su ambiente genético natural, y está por lo tanto libre de otras secuencias de codificación extrañas o indeseadas y está en una forma adecuada para su uso dentro de sistemas de producción de proteína genéticamente modificada. Así, un polinucleótido sustancialmente puro contiene a lo sumo 10% en peso de otro material polinucleótido con el que está originalmente asociado (porcentajes inferiores de otro material polinucleótido se prefieren, por ejemplo a lo sumo 8% en peso, a lo sumo 6% en peso, a lo sumo 5% en peso, a lo sumo 4% en peso a lo sumo 3% en peso, a lo sumo 2% en peso, a lo sumo 1% en peso y a lo sumo ½% en peso). Un polinucleótido sustancialmente puro puede incluir, no obstante, regiones no traducidas 5' y 3' de origen natural, tales como promotores y terminadores. Se prefiere que el polinucleótido sustancialmente puro sea al menos 92% puro, es decir que el polinucleótido constituya al menos 92% en peso del material de polinucleótido total presente en la preparación, y se prefieren porcentajes más altos tal 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, al menos 99% puro y a lo sumo 99,5% puro. Los polinucleótidos que aquí se describen están preferiblemente en una forma sustancialmente pura. En particular, se prefiere que los polinucleótidos que aquí se describen estén en "forma esencialmente pura", es decir, que la preparación polinucleótida esté esencialmente libre de otro material polinucleótido con el cual está originalmente asociado. Aquí, el término "polinucleótido sustancialmente puro" es sinónimo de los términos "polinucleótido aislado" y "polinucleótido en forma aislada".

[0023] Modificación/modificaciones: en el contexto de la presente invención del término "modificación/modificaciones" se refiere a cualquier modificación química del polipéptido que consista en la secuencia de aminoácidos mostrada como los aminoácidos 1 a 233 de SEC ID n°: 2 así como a la manipulación genética del ADN que codifica ese polipéptido. La modificación/modificaciones pueden ser reemplazo/s de la/las cadena/s laterales de aminoácido, sustitución/sustituciones, delección/delecciones y/o inserción/inserciones en el aminoácido/s de interés.

[0024] Variante artificial: cuando se usa aquí, el término "variante artificial" se refiere a un polipéptido que tiene actividad de lisozima, que ha sido producido por un organismo que expresa un gen modificado en comparación con la SEC ID n°: 1. El gen modificado, del que se produce dicha variante cuando se expresa en un huésped adecuado, se obtiene a través de la intervención humana por modificación de la secuencia de nucleótidos descrita en la SEC ID n°: 1.

[0025] ADNc: el término "ADNc", cuando se usa en el presente contexto, pretende cubrir una molécula de ADN que se pueda preparar por transcripción inversa de una molécula de ARNm empalmada, madura, derivada de una célula eucariota. Al ADNc le faltan las secuencias de intrones que están normalmente presentes en el ADN genómico correspondiente. La transcripción de ARN inicial primaria es un precursor para ARNm y pasa por una serie de eventos de tratamiento antes de aparecer como ARNm empalmado maduro. Estos eventos incluyen la eliminación de las secuencias de intrones por un proceso llamado empalme. Cuando el ADNc es derivado de ARNm, a éste le faltan por lo tanto las secuencias de intrones.

[0026] Constructo de ácidos nucleicos: cuando se usa aquí, el término "constructo de ácidos nucleicos" se refiere a una molécula de ácido nucleico, bien mono- o bicatenaria, que se aísla a partir de un gen de origen natural o que se ha modificado para contener segmentos de ácidos nucleicos de manera que no existirían de otro modo en la naturaleza. El término constructo de ácidos nucleicos es sinónimo del término "casete de expresión" cuando el constructo de ácidos nucleicos contiene las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia codificante de la presente invención.

[0027] Secuencia de control: el término "secuencias de control" se define aquí para incluir 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 foránea de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Tales secuencias de control incluyen, pero de forma no limitativa, un líder, una secuencia de poliadenilación, una secuencia de propéptido, un promotor, una secuencia de péptido señal y un terminador de transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor y señales de parada transcripcionales y traduccionales. Las secuencias de control pueden estar provistas de enlaces para introducir sitios de restricción específicos que faciliten el ligamiento de las secuencias de control con la región de codificación de la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido. Operativamente enlazado: el término "operativamente enlazado" se define aquí como una configuración en la que una secuencia de control está apropiadamente colocada en una posición relativa de la secuencia de codificación de la secuencia de ADN de manera que la secuencia de control dirija la expresión de un polipéptido.

[0028] Secuencia codificante: cuando se usa aquí el término "secuencia codificante" se pretende cubrir una secuencia de nucleótidos, que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de su producto proteínico. Los límites de la

secuencia codificante están generalmente determinados por un marco de lectura abierto, que normalmente empieza con el codón de inicio ATG. La secuencia codificante típicamente incluye ADN, ADNc y secuencias de nucleótidos recombinantes.

5 [0029] Expresión: en el presente contexto, el término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción del polipéptido que incluye, pero no está limitado a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.

10 [0030] Vector de expresión: en el presente contexto, el término "vector de expresión" cubre una molécula de ADN, lineal o circular, que comprende un segmento que codifica un polipéptido de la invención, y que está operativamente enlazado a segmentos adicionales que proporcionan su transcripción.

15 [0031] Célula huésped: el término "célula huésped", como se utiliza en este caso, incluye cualquier tipo de célula que sea susceptible de transformación con un constructo de ácidos nucleicos. En el caso de que se use una célula bacteriana como célula huésped, ésta no será adecuada para la expresión del polipéptido fúngico de la invención, no obstante, una célula huésped bacteriana se puede utilizar para fines de clonación.

20 [0032] Los términos, "sonda de polinucleótidos", "hibridación" así como las diferentes condiciones de astringencia se definen en la sección titulada "polipéptidos que tienen actividad de lisozima".

Descripción detallada de la invención

Polipéptidos que tienen actividad de lisozima

25 [0033] El polipéptido de la invención se aisló a partir de un hongo, más precisamente de un *Pycnoporus cinnabarinus* un sinónimo es *Trametes cinnabarina* en una selección para polipéptidos altamente segregados y la función del polipéptido determinado.

30 [0034] En una primera forma de realización, la presente invención se refiere al polipéptido fúngico que tiene actividad de lisozima y que pertenece a la familia GH25 seleccionado del grupo que consiste en:

(a) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos, que tiene al menos 80% de identidad con los aminoácidos 1 a 233 de SEC ID n°: 2;

35 (b) un polipéptido que es codificado por una secuencia de nucleótidos que hibridiza bajo condiciones de astringencia altas con una sonda polinucleótida que consiste en la cadena complementaria de nucleótidos 84 a 782 de SEC ID n°: 1 o

(c) un fragmento de (a) o (b) que tiene actividad de lisozima;

40 donde el polipéptido tiene un pH óptimo en pH 5. La clasificación de la actividad de la enzima EC 3.2.1.17 abarca las enzimas que desempeñan la hidrólisis de los 1,4-beta-enlaces entre N-acetil-D- glucosamina y ácido N-acetilmurámico en los peptidoglicanos heteropolímeros de la pared celular de los procariotas. Una enzima puede tener una especificidad de sustrato (por ejemplo ácido N-acetilmurámico) sin la otra (N-acetil-D-glucosamina en este caso).

45 [0035] La familia GH25 es una clasificación de enzimas según la clasificación de la familia de glicosil hidrolasas de Henrissat (Henrissat B., A classification of glycosyl hydrolases based on aminoacid 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); Davies G., Henrissat B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. Structure 3:853-859(1995)).

50 [0036] Además de GH25, otras familias de enzima hidrolasa con actividad de lisozima (EC 3.2.1.17) son GH22, GH23 y GH24. Familia GH22 o lisozima C incluye lisozima de clara de huevo de gallina y las lisozimas de estómago de rumiantes. Esta familia es la más extensivamente estudiada de las cuatro familias. GH23 comúnmente conocida como lisozima G está representada por la oca y un número de fagos menos estudiados y secuencias bacterianas a partir de proyectos de secuenciación de genoma. GH24 incluye sobre todo el fago T4 y otro fago y lisozimas bacterianas. Las investigaciones de Seo *et al.* 2003 (Seo HJ; Kitaoka M; Ohmiya K; Hayashi K., (2003) Substrate specificity of the N,6-O-diacetylmuramidase from *Streptomyces globisporus*. Journal of Bioscience and Bioengineering, Vol. 95 (3) pp. 313-316) han mostrado que, al menos en el caso de la enzima GH25 de *Streptomyces globisporus*, diferentes espectros de actividad se observaron en comparación con la lisozima de clara de huevo de gallina GH22. La enzima de *Streptomyces* posee tanto actividad de N-acetilmuramidasa como de N,6-O-diacetylmuramidasa. Esto permitió que la enzima de *Streptomyces globisporus* degradara las paredes celulares de *Staphylococcus aureus*, que son altamente acetiladas. Esta actividad puede ser extrapolable a otras enzimas de lisozima de esta familia tales como la lisozima GH25 de la invención.

[0037] En otra forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos donde los polipéptidos comprenden, preferiblemente consisten en, una secuencia de aminoácidos que tiene un grado de identidad con los aminoácidos 1 a 233 de SEC ID n°: 2 de al menos 80%, tal como al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% (en adelante "polipéptidos homólogos"). En una forma de realización interesante, la secuencia de aminoácidos difiere en al menos diez aminoácidos (por ejemplo en diez aminoácidos), en particular en al menos cinco aminoácidos (por ejemplo, en cinco aminoácidos), tal como en al menos cuatro aminoácidos (por ejemplo, en cuatro aminoácidos), por ejemplo, en al menos tres aminoácidos (por ejemplo, en tres aminoácidos) de los aminoácidos 1 a 233 de SEC ID n°: 2. En una forma de realización interesante particular, la secuencia de aminoácidos difiere en al menos dos aminoácidos (por ejemplo en dos aminoácidos), tal como en un aminoácido de los aminoácidos 1 a 233 de SEC ID n°: 2.

[0038] Preferiblemente, los polipéptidos de la presente invención comprenden la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 2, una variante alélica de la misma o un fragmento de la misma que tiene actividad de lisozima. En otra forma de realización preferida, el polipéptido de la presente invención comprende los aminoácidos 1 a 233 de SEC ID n°: 2. En otra forma de realización preferida, el polipéptido consiste en los aminoácidos 1 a 233 de SEC ID n°: 2.

[0039] Polipéptidos de la invención pueden ser una lisozima de tipo salvaje identificada y aislada a partir de una fuente natural. Tales polipéptidos de tipo salvaje se pueden identificar específicamente, por ejemplo, por un método de bioinformática, que es un método que puede utilizarse para identificar candidatos de lisozima. En resumen, los candidatos de lisozima GH25 se pueden identificar directamente en un proyecto de secuenciación de genoma o ADNc usando una lisozima conocida de la familia GH25 como secuencia de búsqueda. Otro método es comparar todos los fragmentos de ADN únicos (secuencias contiguas) un programa de búsqueda de homología estándar tal como WU-BlastX (2.0a19MP_WashU). Además, el polipéptido de la invención se puede preparar por la técnica de redistribución de ADN, tal como se describe en J.E. Ness *et al.* Nature Biotechnology 17, 893-896 (1999)). Además, el polipéptido de la invención puede ser una variante artificial que comprenda, preferiblemente consista en, una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una sustitución, delección y/o inserción de un aminoácido en comparación con los aminoácidos 1 a 233 de SEC ID n°: 2. Tales variantes artificiales se pueden construir por técnicas estándar conocidas en la técnica, tal como por mutagénesis dirigida al sitio/aleatoria del polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada como los aminoácidos 1 a 233 de SEC ID n°: 2. 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, es decir sustituciones de aminoácidos conservadoras que no afectan significativamente el plegado y/o la actividad de la proteína; pequeñas delecciones, típicamente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; pequeñas extensiones amino o carboxil-terminales, tales como un residuo de metionina aminoterminal; un pequeño péptido enlazador de hasta aproximadamente 20-25 residuos; o una pequeña extensión que facilita la purificación cambiando la carga de red u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión.

[0040] Ejemplos de sustituciones conservadoras están en el grupo de los aminoácidos básicos (arginina, lisina e 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 la actividad específica se conocen en la técnica y son descritas, por ejemplo, por H. Neurath y R.L. Hill, 1979, In, The Proteins, Academic Press, New York. Los intercambios que se producen 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/Val, Ala/Glu y Asp/Gly al igual que éstos a la inversa.

[0041] En una forma de realización interesante de la invención, los cambios de aminoácidos son de tal naturaleza que las propiedades físico químicas de los polipéptidos se ven alteradas. Por ejemplo, los cambios de aminoácidos se pueden realizar de manera que mejoren la termoestabilidad del polipéptido, que alteren la especificidad de sustrato, que cambien el pH óptimo y similares.

[0042] Preferiblemente, el número de tales sustituciones, delecciones y/o inserciones en comparación con los aminoácidos 1 a 233 de SEC ID n°: 2 es como mucho 10, tal como mucho 9, por ejemplo, a lo sumo 8, de forma más preferible a lo sumo 7, por ejemplo a lo sumo 6, tal como a lo sumo 5, de la forma más preferible a lo sumo 4, por ejemplo a lo sumo 3, tal como a lo sumo 2, en particular a lo sumo 1.

[0043] En una otra forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos que tienen actividad de lisozima que son codificados por secuencias de nucleótidos que hibridan bajo condiciones de astringencia altas, y preferiblemente bajo condiciones de astringencia altísimas con una sonda polinucleótida que consiste en la cadena complementaria de los nucleótidos 84 a 782 de SEC ID n°: 1 (J. Sambrook, E.F. Fritsch, y T. Maniatus, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d edition, Cold Spring Harbor, New York).

[0044] La secuencia de nucleótidos de SEC ID n°: 1 o una subsecuencia de la misma, al igual que la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 2 o un fragmento de la misma, se pueden utilizar para diseñar una sonda polinucleótida para identificar y clonar ADN que codifica polipéptidos que tienen actividad de lisozima de cepas de diferentes géneros o especies según métodos bien conocidos en la técnica. En particular, tales sondas se pueden usar para hibridación con el ADNc o genómico del género o las especies de interés, siguiendo procedimientos de transferencia de Southern

estándar, para identificar y aislar el gen correspondiente del mismo. Tales sondas pueden ser considerablemente más cortas que toda la secuencia, pero deberían tener al menos 15, preferiblemente al menos 25, de forma más preferible al menos 35 nucleótidos de longitud, tal como al menos 70 nucleótidos de longitud. No obstante, se prefiere que la sonda de polinucleótidos tenga al menos 100 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, la sonda polinucleótida puede tener al menos 200 nucleótidos de longitud, al menos 300 nucleótidos de longitud, al menos 400 nucleótidos de longitud o al menos 500 nucleótidos de longitud. Incluso se pueden utilizar sondas más largas, por ejemplo, sondas polinucleótidas que tengan al menos 600 nucleótidos de longitud, al menos 700 nucleótidos de longitud, al menos 800 nucleótidos de longitud, o al menos 900 nucleótidos de longitud. Se pueden usar tanto sondas de ADN como de ARN. Las sondas están típicamente marcadas para detectar el gen correspondiente (por ejemplo, con ^{32}P , ^3H , ^{35}S , biotina o avidina).

[0045] Así, un ADN genómico o genoteca de ADNc obtenido a partir de tales otros organismos se pueden seleccionar para ADN que hibridiza con las sondas descritas anteriormente y que codifica un polipéptido que tiene actividad de lisozima. ADN genómico u otro ADN de tales otros organismos se pueden separar por electroforesis en gel de poli(acrilamida o agarosa, u otras técnicas de separación. ADN de las bibliotecas o el ADN separado se pueden transferir, e inmovilizar, en la nitrocelulosa u otros materiales portadores adecuados. Para identificar un clon o ADN que sea homólogo de la SEC ID n°: 1 el material portador con el ADN inmovilizado se usa en una transferencia de Southern.

[0046] Para fines de la presente invención, la hibridación indica que la secuencia de nucleótidos hibridiza a una sonda de polinucleótidos marcada que hibridiza a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID n°: 1 bajo muy bajas a muy altas condiciones de astringencia. Moléculas a la que la sonda polinucleótida hibridiza bajo estas condiciones se pueden detectar usando una película radiográfica o por cualquier otro método conocido en la técnica. Siempre que se usa el término "sonda polinucleótida" en el presente contexto, deben entenderse que tal sonda contiene al menos 15 nucleótidos.

[0047] En una forma de realización interesante, la sonda polinucleótida es la cadena complementaria de nucleótidos 84 a 782 de SEC ID n°: 1.

[0048] En otra forma de realización interesante, la sonda polinucleótida es la cadena complementaria de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de SEC ID n°: 2. En otra forma de realización interesante, la sonda polinucleótida es la cadena complementaria de SEC ID n°: 1. En otra forma de realización interesante, la sonda polinucleótida es la cadena complementaria de la región de codificación de polipéptido maduro de SEC ID n°: 1.

[0049] Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, se definen condiciones de astringencia de muy bajas a altísimas tales como pre-hibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 1,0% de SDS, 5X solución de Denhardt, 100 µg/ml ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, siguiendo procedimientos de transferencia de Southern de estándar. Preferiblemente, las sondas largas de al menos 100 nucleótidos no contienen más de 1.000 nucleótidos. Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, el material portador se lava finalmente tres veces cada uno durante 15 minutos usando 2 x SSC, 0,1% de SDS a 42°C (astringencia muy baja), se lava preferiblemente tres veces cada uno durante 15 minutos usando 0,5 x SSC, 0,1% de SDS a 42°C (astringencia baja), se lava de forma más preferible tres veces cada uno durante 15 minutos usando 0,2 x SSC, 0,1% de SDS a 42°C (astringencia media), se lava incluso de forma más preferible tres veces cada uno durante 15 minutos usando 0,2 x SSC, 0,1% de SDS a 55°C (astringencia media alta), se lava de la forma más preferible tres veces cada uno durante 15 minutos usando 0,1 x SSC, 0,1% de SDS a 60°C (astringencia alta), en particular se lava tres veces cada uno durante 15 minutos usando 0,1 x SSC, 0,1% de SDS a 68°C (astringencia muy alta).

[0050] Aunque no se prefiere particularmente, se contempla que sondas más cortas, por ejemplo sondas que sean de aproximadamente 15 a 99 nucleótidos de longitud, tal como de aproximadamente 15 a aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, se pueden usar también. Para este tipo de sondas cortas, se definen condiciones de astringencia tales como prehibridación, hibridación y post-hibridación de lavado de 5°C a 10°C por debajo de la T_m usando el cálculo según Bolton y McCarthy (1962, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 48:1390) en 0,9 M NaCl, 0,09 M de Tris-HCl pH 7,6, 6 mM de EDTA, 0,5% de NP- 40, 1X solución de Denhardt, 1 mM de pirofosfato de sodio, 1 mM de fosfato monobásico de sodio, 0,1 mM de ATP y 0,2 mg de ARN de levadura por ml siguiendo procedimientos de transferencia de Southern estándar.

[0051] Para sondas cortas que son de aproximadamente 15 nucleótidos a 99 nucleótidos de longitud, el material portador se lava una vez en 6X SSC más 0,1% de SDS durante 15 minutos y dos veces cada una durante 15 minutos usando 6X SSC de 5°C a 10°C por debajo de la T_m calculada.

Actividad de lisozima

[0052] Se han descrito diferentes ensayos para la determinación de actividad de lisozima. Un ensayo descrito en J. Biochem. (H. Maeda, 1980, vol. 88 (4): 1185-1191) se basa en la polarización de fluorescencia o la intensidad de fluorescencia utilizando peptidoglicano marcado con fluoresceína como un sustrato, que se obtuvo de *Micrococcus lysodeikticus*.

[0053] Otro ensayo se basa en el espacio libre de una suspensión de *Micrococcus luteus* provocada por la lisozima y monitorizada a 450 nm y en comparación con un estándar de lisozima de actividad conocida. Este ensayo fue desarrollado en el FIP Center for Standards, International Commission on Pharmaceutical Enzymes, Harelbekestraat 72, B-9000 gent, Bélgica. Este ensayo requiere el uso de células ATCC 4698 liofilizadas, viables de *M. luteus*. Este sustrato está disponible del Center for Standards al igual que un protocolo detallado.

[0054] Otro ensayo, EnzChek® Lysozyme Assay Kit (E-22013), está disponible a partir de sondas moleculares, y se basa en una medida de la actividad de lisozima en las paredes celulares de *Micrococcus lysodeikticus* que están marcadas con fluoresceína.

Fuentes para polipéptidos que tienen actividad de lisozima

[0055] Un polipéptido de la presente invención es un polipéptido fúngico. "Hongos", como se utiliza en este caso, incluye el filo *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* y *Zygomycota* (como es definido por Hawkswort *et al.* en Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8th edition, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, Reino Unido) al igual que el *Oomycota* (como se cita en Hawkswort *et al.*, 1995, *supra*, página 171) y todos los hongos mitospóricos (Hawkswort *et al.*, 1995, *supra*).

[0056] En una forma de realización particular, el polipéptido fúngico es un polipéptido de levadura. "Levadura", como se utiliza en este caso, incluye levadura ascosporógena (Endomicetales), levadura basidioesporogénea y levadura de los Fungi Imperfecti (Blastomicetos). Dado que la clasificación de levadura puede cambiar en el futuro, para los fines de esta invención, la levadura debe ser definida como se describe en Biology and Activities of Yeast (Skinner, F.A., Passmore, S.M., and Davenport, R.R., eds, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series No. 9, 1980).

[0057] El polipéptido de levadura es en una forma de realización particular un polipéptido de *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Yarrowia*. En una forma de realización interesante, el polipéptido es un polipéptido de *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis* o *Saccharomyces oviformis*.

[0058] En otra forma de realización particular, el polipéptido fúngico de la invención es un polipéptido fúngico filamentoso tal como un polipéptido de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Piromyces*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolyopcladium* o *Trichoderma*.

[0059] En otra forma de realización interesante, el polipéptido es un polipéptido de *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Fusarium bactridioides*, *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 torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *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*.

[0060] Se entiende que para las especies anteriormente mencionadas, la invención abarca tanto los estados perfectos como los imperfectos, y otros equivalentes taxonómicos, por ejemplo, anamorfos, independientemente del nombre de la especie por la que son conocidos. Expertos en la técnica reconocerán fácilmente la identidad de los equivalentes apropiados.

[0061] Cepas de estas especies son de fácil acceso para el público en varias colecciones de cultivo, tales como American Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS y Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

[0062] Además, tales polipéptidos se pueden identificar y obtener a partir de otras fuentes que incluyen microorganismos aislados de la naturaleza (por ejemplo, tierra, abonos, agua, etc.) utilizando las sondas mencionadas anteriormente. Técnicas para aislar microorganismos de hábitats naturales son bien conocidas en la técnica. La secuencia de nucleótidos se puede derivar de forma similar por selección de una genoteca de ADNc o genómica de otro microorganismo. Una vez que una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido se ha detectado con la sonda o sondas, la secuencia se puede aislar o clonar utilizando técnicas conocidas por los técnicos en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

[0063] Polipéptidos codificados por secuencias de nucleótidos de la presente invención también incluyen polipéptidos fusionados o polipéptidos divisibles de fusión donde otro polipéptido se fusiona al N-terminal o al C-terminal del polipéptido o fragmento del mismo. Un polipéptido fusionado se produce por fundición 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 la técnica, e incluyen ligamiento de las secuencias de codificación que codifican los polipéptidos de modo que éstas estén en bastidor y que la expresión del polipéptido fusionado esté bajo control del mismo promotor o promotores y terminador.

5 Polinucleótidos y secuencias de nucleótidos

[0064] La presente invención también se refiere a polinucleótidos que tienen una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido de la invención. En particular, la presente invención se refiere a polinucleótidos que consisten en una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido de la invención. En una forma de realización particular, la secuencia de nucleótidos se expone en SEC ID n°: 1. En una forma de realización más particular, la secuencia de nucleótidos 139-724 es la región de codificación del polipéptido maduro de SEC ID n°: 1. La presente invención también abarca los polinucleótidos que tienen, preferiblemente consistente en, las secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 2 o el polipéptido maduro de la misma, que difiere de SEC ID n°: 1 en virtud de la degeneración del código genético.

[0065] La presente invención también se refiere a polinucleótidos que tienen, preferiblemente consistente en, una subsecuencia de SEC ID N°: 1 que codifica fragmentos de SEC ID n°: 2 que tienen actividad de lisozima. Una subsecuencia de SEC ID n°: 1 es una secuencia de nucleótidos abarcada por SEC ID n°: 1 excepto que un o más nucleótidos del extremo 5' y/o 3' se han eliminado.

[0066] La presente invención también se refiere a polinucleótidos que tienen, preferiblemente consistente en, una secuencia de nucleótidos modificada que comprende al menos una modificación en la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n°: 1, y donde la secuencia de nucleótidos modificada codifica un polipéptido que consiste en los aminoácidos 19 a 233 de SEC ID n°: 2.

[0067] Las técnicas usadas para aislar o clonar una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido se conocen en la técnica e incluyen el aislamiento de ADN genómico, preparación de ADNc o una combinación de los mismos. La clonación de las secuencias de nucleótidos de la presente invención a partir de tal ADN genómico se pueden efectuar, por ejemplo, usando la bien conocida reacción en cadena de polimerasa (PCR) o selección de anticuerpo de bibliotecas de expresión para detectar fragmentos de ADN clonado con características estructurales compartidas. Véase, por ejemplo, Innis *et al.*, 1990, PCR: A Guide to Methods and Application, Academic Press, Nueva York. 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) se pueden utilizar. La secuencia de nucleótidos se puede clonar a partir de una cepa de *Aspergillus*, u otro organismo u organismo relacionado y así, por ejemplo, puede ser una variante alélica o de especie de la región de codificación del polipéptido de la secuencia de nucleótidos.

[0068] La secuencia de nucleótidos se puede obtener por procedimientos de clonación estándar usados en ingeniería genética para recolocar la secuencia de nucleótidos a partir de su ubicación natural en un sitio diferente dónde se reproducirá. Los procedimientos de clonación pueden implicar escisión y aislamiento de un fragmento deseado que comprenda 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 múltiples copias o clones de la secuencia de nucleótidos serán replicados. La secuencia de nucleótidos puede ser genómica, de ADNc, de ARN, de origen semisintético, de origen sintético o cualquier combinación de los mismos.

[0069] La presente invención también se refiere a un polinucleótido que tiene, preferiblemente consistente en, una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 85% de identidad con los nucleótidos de 84 a 782 de SEC ID n°: 1. Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos tiene al menos 90% de identidad, preferiblemente al menos 95% de identidad, tal como al menos 96% de identidad, por ejemplo al menos 97% de identidad, incluso de forma más preferible al menos 98% de identidad, tal como al menos 99% con los nucleótidos 84 a 782 de SEC ID n°: 1. Particularmente, la secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido que tiene actividad de lisozima. El grado de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina como se ha descrito previamente (véase la sección titulada "Definiciones").

[0070] La modificación de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser necesaria para la síntesis de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una sustitución, delección y/o inserción en comparación con los aminoácidos 1 a 233 de SEC ID n°: 2. Estas variantes artificiales puede diferir en alguna forma de ingeniería del polipéptido aislado de su fuente nativa, por ejemplo, variantes que difieren en la actividad específica, termoestabilidad, pH óptimo o similares.

[0071] Será evidente para los expertos en la técnica que tales modificaciones se pueden hacer fuera de las regiones críticas para la función de la molécula y todavía suponer un polipéptido activo. Residuos de aminoácidos esenciales para la actividad del polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos de la invención, y por lo tanto preferiblemente no sujetas a modificación, tal como sustitución, se pueden identificar según procedimientos conocidos en la técnica, tal como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de escaneado de alanina (véase, por ejemplo, Cunningham and Wells, 1989, Science 244: 1081-1085). En la última técnica, se introducen mutaciones en cada residuo positivamente cargado de la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se evalúan para actividad de lisozima (como se describe en los ejemplos) para identificar residuos de aminoácidos que sean críticos para la actividad de la

molécula. También se pueden determinar sitios de interacción enzima-sustrato por análisis de la estructura tridimensional tal y como se determina por técnicas tales como el análisis por resonancia magnética nuclear, cristalografía o etiquetado de fotoafinidad (véase, por ejemplo, de Vos *et al.*, 1992, Science 255: 306-312; Smith *et al.*, 1992, Journal of Molecular Biology 224: 899-904; Wlodaver *et al.*, 1992, FEBS Letters 309: 59- 64).

[0072] Además, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención se puede modificar por introducción de sustituciones de nucleótido que no den lugar a otra secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos, pero que corresponda al uso de codón del organismo huésped destinado a la producción de la enzima.

[0073] La introducción de una mutación en la secuencia de nucleótidos para intercambiar un nucleótido con otro nucleótido se puede realizar por mutagénesis dirigida al sitio utilizando cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. Particularmente útil es el procedimiento que utiliza un vector de ADN superenrollado, bicatenario con un inserto de interés y dos cebadores sintéticos que contienen la mutación deseada. Los cebadores oligonucleótidos, cada uno complementarios de cadenas opuestas del vector, se extienden durante los ciclos de temperatura mediante polimerasa de DNA *Pfu*. En la incorporación de los cebadores, se genera un plásmido mutado que contiene cortes en bisel. Después del ciclo de temperatura, el producto se trata con DpnI que es específico para que el ADN metilado y hemimetilado asimile el molde de ADN parental y seleccione para ADN sintetizado que contenga mutación. Otros procedimientos conocidos en la técnica también se pueden usar. Para una descripción general de sustitución de nucleótidos, véase, por ejemplo, Ford *et al.*, 1991, Protein Expression and Purification 2: 95-107. La presente invención también se refiere a un polinucleótido que tiene, preferiblemente consistente en, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad de lisozima, y que hibridiza bajo condiciones de astringencia altas con una sonda polinucleótida que consiste en la cadena complementaria de los nucleótidos 84 a 782 de SEC ID n°: 1.

[0074] Como se entenderá, los detalles y la indicaciones relativas a la hibridación de las secuencias de nucleótidos serán iguales o análogos a los aspectos de hibridación discutidos en la sección titulada "Polipéptidos que tienen activada de lisozima" de la presente.

Constructos de ácidos nucleicos

[0075] La presente invención también se refiere a constructos de ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de nucleótidos de la presente invención operativamente enlazada a uno o más secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

[0076] Una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención se puede manipular de una variedad de formas para proporcionar la expresión del polipéptido. La manipulación de la secuencia de nucleótidos antes de la inserción en un vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para modificar secuencias de nucleótidos utilizando métodos de ADN recombinante se conocen bien en la técnica.

[0077] La secuencia de control puede ser una secuencia promotora apropiada, una secuencia de nucleótidos que sea reconocida por una célula huésped para la expresión de la secuencia de nucleótidos. La secuencia promotora contiene secuencias de control transcripcionales, que medien la expresión del polipéptido. El promotor puede ser cualquier secuencia de nucleótidos que muestre actividad transcripcional en la célula huésped de elección incluyendo promotores mutantes, truncados e híbridos, y se puede obtener a partir de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares ya sean homólogos o heterólogos de la célula huésped.

[0078] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácidos nucleicos de la presente invención en una célula huésped fúngica filamentosa son promotores obtenidos a partir de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteinasa 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), al igual que el promotor NA2-tpi (un híbrido de los promotores de los genes para alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*), y promotores mutantes, truncados e híbridos de los mismos.

[0079] En un huésped de levadura, los promotores útiles se obtienen a partir de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), galactocinasa de *Saccharomyces cerevisiae* (GAL1), alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH2/GAP) y 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros promotores útiles para células huésped de levadura son descritos por Romanos *et al.*, 1992, Yeast 8: 423-488.

[0080] La secuencia de control también puede ser una secuencia terminadora de transcripción adecuada, una secuencia reconocida por una célula huésped para terminar la transcripción. La secuencia terminadora está operativamente enlazada al término 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Cualquier terminador que sea funcional en la célula huésped de elección se puede utilizar en la presente invención.

[0081] Terminadores preferidos para células huésped fúngicas filamentosas se obtienen a partir de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger* y proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.

[0082] Terminadores preferidos para células huésped de levadura se obtienen a partir de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, citocromo C de *Saccharomyces cerevisiae* (CYC1), y gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros terminadores útiles para células huésped de levadura son descritos por Romanos *et al.*, 1992, *supra*.

[0083] La secuencia de control también puede ser una secuencia líder adecuada, una región no traducida de un ARNm que sea importante para la traducción por la célula huésped. La secuencia líder está operativamente enlazada al 5' terminal de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Cualquier secuencia líder que sea funcional en la célula huésped de elección se puede utilizar en la presente invención.

[0084] Líderes preferidos para células huésped fúngicas filamentosas se obtienen a partir de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

[0085] Líderes adecuados para células huésped de levadura se obtienen a partir de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae* y alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH2/GAP).

[0086] La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia operativamente enlazada al 3' terminal de la secuencia de nucleótidos y que, cuando es transcrita, es reconocida por la célula huésped como una señal para añadir residuos de poliadenosina al ARNm transcrito. Cualquier secuencia de poliadenilación que sea funcional en la célula huésped de elección se puede utilizar en la presente invención.

[0087] Secuencias de poliadenilación preferidas para células huésped fúngicas filamentosas 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*.

[0088] Secuencias de poliadenilación útiles para células huésped de levadura son descritas por Guo y Sherman, 1995, *Molecular Cellular Biology* 15: 5983-5990.

[0089] La secuencia de control también puede ser una región codificante del péptido señal que codifique para una secuencia de aminoácidos enlazada al amino terminal de un polipéptido y dirija el polipéptido codificado en la vía secretora de la célula. El extremo 5' de la secuencia codificante de la secuencia de nucleótidos puede intrínsecamente contener una región codificante del péptido señal naturalmente enlazada en el marco de lectura de traducción con el segmento de la región de codificación que codifica el polipéptido segregado. Alternativamente, el extremo 5' de la secuencia codificante puede contener una región codificante del péptido señal que sea foránea a la secuencia codificante. La región codificante del péptido señal foráneo se puede requerir donde la secuencia codificante no contiene naturalmente una región codificante del péptido señal. Alternativamente, la región codificante del péptido señal foráneo puede simplemente reemplazar la región codificante del péptido señal natural para mejorar 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 se puede utilizar en la presente invención.

[0090] La región codificante del péptido señal es los nucleótidos 84 a 138 de SEC ID n°: 1 que codifican los aminoácidos 1 a 18 de SEC ID n°: 2.

[0091] Regiones codificantes del péptido señal eficaces para células huésped fúngicas filamentosas 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*.

[0092] Péptidos señal útiles para células huésped de levadura se obtienen a partir de los genes para alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae* e invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otras regiones codificantes del péptido señal útiles son descritas por Romanos *et al.*, 1992, *supra*.

[0093] La secuencia de control también puede ser una región codificante del propéptido que codifica para una secuencia de aminoácidos situada en el amino terminal de un polipéptido. El polipéptido resultante es conocido como una proenzima o propolipéptido (o un zimógeno en algunos casos). Un propolipéptido es generalmente inactivo y se puede convertir en un polipéptido activo maduro por escisión catalítica o autocatalítica del propéptido a partir del propolipéptido.

[0094] Donde tanto el péptido señal como las regiones de propéptido están presentes en el amino terminal de un polipéptido, la región de propéptido está situada junto al amino terminal de un polipéptido y la región de péptido señal está situada junto al amino terminal de la región de propéptido.

[0095] También puede ser deseable añadir secuencias reguladoras que permitan la regulación de la expresión del polipéptido con respecto al crecimiento de la célula huésped. Ejemplos de sistemas reguladores son los que hacen que la expresión del gen se ponga en ON u OFF en respuesta a una sustancia química o estímulo físico, incluyendo la presencia de un compuesto regulador. Sistemas reguladores en levadura incluyen el sistema ADH2 o el sistema GAL1, que se pueden usar. En hongos filamentosos, el promotor de alfa-amilasa TAKA, promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae* se pueden utilizar como secuencias reguladoras. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son los que permiten la amplificación génica. En sistemas eucarióticos, estos 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 estaría operativamente enlazada con la secuencia reguladora.

Vectores de expresión

[0096] La presente invención también se refiere a vectores de expresión recombinantes que comprenden el constructo de ácidos nucleicos de la invención. Los diferentes nucleótidos y secuencias de control anteriormente descritos se pueden unir juntos para producir un vector de expresión recombinante que pueda incluir uno o más sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o sustitución de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido en tales sitios. Alternativamente, la secuencia de nucleótidos de la presente invención se puede expresar por inserción de la secuencia de nucleótidos o un constructo de ácidos nucleicos que comprende la secuencia en un vector apropiado para la expresión. En la creación del vector de expresión, la secuencia codificante se localiza en el vector de modo que la secuencia codificante esté operativamente enlazada con las secuencias de control apropiadas para la expresión.

[0097] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o virus) que pueda ser convenientemente sometido a procedimientos de ADN recombinante y pueda provocar la expresión de la secuencia de nucleótidos. La elección del vector típicamente dependerá de la compatibilidad del vector con la célula huésped en la que el vector debe ser introducido. Los vectores puede ser plásmidos lineales o circulares cerrados.

[0098] El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que exista como una entidad extracromosómica, cuya replicación sea independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial.

[0099] El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser un vector que, cuando se introduzca en la célula huésped, se integre en el genoma y se replique junto con el cromosoma o cromosomas en los que se ha integrado. Además, un único vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contengan el ADN total que se va a introducir en el genoma de la célula huésped o un transposón se puede utilizar.

[0100] Los vectores de la presente invención preferiblemente contienen uno o más marcadores seleccionables que permiten la selección fácil de células transformadas. Una etiqueta seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia biocida o vírica, resistencia a los metales pesados, prototrofia a los auxótrofos y similares.

[0101] Marcadores adecuados para las células huésped de levadura son ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 y URA3. Marcadores seleccionables para usar en una célula huésped fúngica filamentosa incluyen, pero de forma no limitativa, *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina-carbamoyltransferasa), *bar* (fosfonitricina acetiltransferasa), *hygB* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrato-reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato-descarboxilasa), *sC* (sulfato adeniltransferasa), *trpC* (antranilato sintasa), al igual que equivalentes de los mismos.

[0102] Se prefieren para su uso en una célula de *Aspergillus* los genes *amdS* y *pyrG* de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y el gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*.

[0103] Los vectores de la presente invención preferiblemente contienen un elemento o elementos que permiten la integración estable del vector en el genoma de la célula huésped o la replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.

[0104] Para la integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede contar con la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido o cualquier otro elemento del vector para integración estable del vector en el genoma por recombinación homóloga o 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 que el vector se integre en el genoma de la célula huésped en una ubicación o ubicaciones precisas del cromosoma o cromosomas. Para aumentar la probabilidad de integración en una ubicación precisa, los elementos integracionales debería preferiblemente contener un número suficiente de nucleótidos, tal como de 100 a 1.500 pares de bases, preferiblemente de 400 a 1.500 pares de bases, y de la forma más preferible de 800 a

1.500 pares de bases, que sean altamente homólogos de la secuencia objetivo correspondiente para mejorar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos integracionales pueden ser cualquier secuencia que sea homóloga de la secuencia objetivo del genoma de la célula huésped. Además, los elementos integracionales pueden ser secuencias de nucleótidos no codificantes o codificantes. Por otro lado, el vector se puede integrar en el genoma de la célula huésped por recombinación no-homóloga.

[0105] Para la replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación que permita al vector replicar de manera autónoma en la célula huésped en cuestión. Ejemplos de orígenes de replicación para su uso en una célula huésped de levadura son el origen de replicación de 2 micras, ARS1, ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3 y la combinación de ARS4 y CEN6. El origen de replicación puede ser un origen que tenga una mutación que haga que su temperatura de funcionamiento sea sensible en la célula huésped (véase, por ejemplo, Ehrlich, 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 1433).

[0106] 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 génico. 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 con la secuencia de nucleótidos donde las células que contienen copias amplificadas del gen marcador seleccionable y, por lo tanto, copias adicionales de la secuencia de nucleótidos, se pueden seleccionar por cultivo de las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

[0107] Los procedimientos usados para enlazar los elementos anteriormente descritos para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención son bien conocidos por un experto en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

Células huésped

[0108] La presente invención también se refiere a una célula huésped recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos de la invención, que se usa ventajosamente en la producción recombinante de los polipéptidos. Un vector que comprende una secuencia de nucleótidos de la presente invención se introduce en una célula huésped de modo que el vector se mantenga como un integrante cromosómico o como un vector extra-cromosómico autorreplicante como se ha descrito anteriormente.

[0109] La célula huésped puede ser una eucariota, tal como una célula de mamífero, insecto, planta o célula fúngica. Para usos de clonación, la célula huésped puede ser una célula bacteriana también, por ejemplo una célula de *E. coli*.

[0110] En una forma de realización preferida, la célula huésped es una célula fúngica. "Hongo", como se utiliza en este caso, incluye el filo *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* y *Zygomycota* (como definido por Hawksworth *et al.*, en Ainsworth y Bisby's Dictionary of The Fungi, 8th edition, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, Reino Unido) al igual que *Oomycota* (como se cita en Hawksworth *et al.*, 1995, *supra*, página 171) y todos los hongos mitospóricos (Hawksworth *et al.*, 1995, *supra*).

[0111] En una forma de realización más preferida, la célula huésped fúngica es una célula de levadura. "Levadura", como se utiliza en este caso incluye levadura ascosporógena (*Endomycetales*), levadura basidioesporogénea y levadura de los *Fungi Imperfecti* (*Blastomycetes*). Dado que la clasificación de levadura puede cambiar en el futuro, para los fines de esta invención, la levadura debe definirse como se describe en Biology and Activities of Yeast (Skinner, F.A., Passmore, S.M., and Davenport, R.R., eds, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series No. 9, 1980).

[0112] 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*.

[0113] 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*.

[0114] En otra forma de realización más preferida, la célula huésped fúngica es una célula fúngica filamentosa. "Fúngica filamentosa" incluye todas las formas filamentosas de la subdivisión *Eumycota* y *Oomycota* (como es definido por Hawksworth *et al.*, 1995, *supra*). Los hongos filamentosos se caracterizan por una pared micelial compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo es por alargamiento hifal y el catabolismo de carbono es estrictamente aeróbico. En cambio, el crecimiento vegetativo por levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* es por injerto de un talo unicelular y el catabolismo de carbono puede ser fermentativo.

[0115] En una forma de realización aún más preferida, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de una especie de, pero no limitado a, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Thielavia*, *Tolypocladium* o *Trichoderma*.

[0116] 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 fúngica filamentosa es una célula de *Fusarium bactridioides*, *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 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*.

[0117] Las células fúngicas se pueden transformar por un proceso que implica la formación de protoplasto, la transformación de los protoplastos y la regeneración de la pared celular de forma conocida *per se*. Procedimientos adecuados para la transformación de células huésped de *Aspergillus* son descritos en la EP 238 023 y Yelton *et al.*, 1984, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81: 1470-1474. Métodos adecuados para transformar especies de *Fusarium* son descritos por Malardier *et al.*, 1989, Gene 78: 147- 156 y la WO 96/00787. La levadura se puede transformar utilizando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, en Abelson, J.N. y Simon, M.I., editors, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Volume 194, pp 182-187, Academic Press, Inc., New York; Ito *et al.*, 1983, Journal of Bacteriology 153: 163; y Hinnen *et al.*, 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 1920.

Métodos de producción

[0118] La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención que comprenda (a) cultivo de una cepa, que en su forma de tipo salvaje sea capaz de producir el polipéptido y (b) recuperación del polipéptido. Preferiblemente, la cepa es del género *Aspergillus*, y de forma más preferible de *Aspergillus oryzae*.

[0119] La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención que comprende (a) cultivo de una célula huésped bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido y (b) recuperación del polipéptido.

[0120] En los métodos de producción de la presente invención, las células se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción del polipéptido utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula se puede cultivar por cultivo en matraz de agitación, fermentación a pequeña escala o a gran escala (incluyendo, lote continuo, lote alimentado o fermentaciones de estado sólido) en laboratorio o fermentadores industriales realizadas en un medio adecuado y bajo condiciones que permitan al polipéptido ser expresado y/o aislado. El cultivo tiene lugar en un medio nutritivo adecuado que comprende fuentes de nitrógeno y carbono y sales inorgánicas, utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según composiciones publicadas (por ejemplo, en catálogos de la American Type Culture Collection). Si el polipéptido es segregado en el medio nutritivo, el polipéptido se puede recuperar directamente del medio. Si el polipéptido no es segregado, se puede recuperar de lisatos celulares.

[0121] Los polipéptidos se pueden detectar usando métodos conocidos en la técnica que sean específicos para los polipéptidos. Estos métodos de detección pueden incluir el uso de anticuerpos específicos, la formación de un producto enzimático o la desaparición de un sustrato enzimático. Por ejemplo, un ensayo enzimático se puede utilizar para determinar la actividad del polipéptido como se describe en este caso.

[0122] El polipéptido resultante se puede recuperar por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido se puede recuperar del medio nutritivo por procedimientos convencionales que incluyen, pero no se limitan a, centrifugado, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación.

[0123] Los polipéptidos de la presente invención se pueden purificar por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, exclusión hidrofóbica, por cromatoenfoco y por tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectroenfoco preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación de sulfato amónico), SDS-PAGE o extracción (véase, por ejemplo, Protein Purification, J.-C. Janson and Lars Ryden, editors, VCH Publishers, Nueva York, 1989).

Composiciones

[0124] En otro aspecto más, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden un polipéptido de la presente invención.

[0125] La composición puede comprender un polipéptido de la invención como el componente enzimático principal, por ejemplo, una composición monocomponente. Alternativamente, la composición puede comprender actividades enzimáticas múltiples, tales como una aminopeptidasa, amilasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celulasa, quitinasa, cutinasa, glicosiltransferasa de ciclodextrina, desoxiribonucleasa, esterasa, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, glucoamilasa, alfa-glucosidasa, beta-glucosidasa, haloperoxidasa, invertasa, lacasa, lipasa, manosidasa, oxidasa, enzima pectinolítica, peptidoglutaminasa, peroxidasa, fitasa, polifenoloxidasa, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa o xilanasa.

[0126] Las composiciones se pueden preparar conforme a métodos conocidos en la técnica y pueden ser en forma de un líquido o una composición seca. Por ejemplo, la composición de polipéptido puede ser en forma de un granulado o un microgranulado. El polipéptido que se va a incluir en la composición se puede estabilizar conforme a métodos conocidos en la técnica.

[0127] Más adelante se dan ejemplos de usos preferidos de las composiciones de polipéptido de la invención. La dosificación de la composición de polipéptido de la invención y otras condiciones bajo las que la composición se usa se pueden determinar basándose en métodos conocidos en la técnica.

Biopelículas

[0128] Los microorganismos que crecen en biopelículas son menos susceptibles a todos los tipos de agentes antimicrobianos que los mismos microorganismos cuando crecen en cultivos de suspensión convencionales.

[0129] Es bien conocido que las bacterias hambrientas pueden ser mucho menos susceptibles a una variedad de desafíos antimicrobianos. Por ejemplo, varios antibióticos tradicionales tales como la penicilina, tienen un mal rendimiento en bacterias de división lenta o que no se dividen. Debido a que la lisozima ataca y destruye la capa de peptidoglucano independientemente del estado de crecimiento de las bacterias, sigue siendo eficaz.

Control de biopelícula; ejemplo líneas de agua dentales:

[0130] La acumulación de biopelícula dentro de una línea de agua dental puede contener biopelículas que consisten en, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Leigonnella sp.* por nombrar algunos. También existe la posibilidad de colonización de especies que generalmente se encuentran en la cavidad bucal como resultado del fallo de las válvulas anti-retracción en el sistema. El riesgo de infección cruzada se vuelve incluso más un riesgo potencial por supuesto cuando pacientes inmunocomprometidos están implicados y en la actualidad el número de pacientes dentro de esta categoría continúa aumentando de manera constante. Existe la necesidad de un control eficaz de la acumulación de biopelícula bacteriana en las líneas de agua dentales. Un reseña sobre biopelículas se puede encontrar en: Watnick P y Kolter R. (2000) Biofilm, city of microbes. J Bacteriol.;182(10):2675-9.

[0131] Un ejemplo típico de un producto de pastilla para la garganta comercial es Lysopaine producida por: BOEHRINGER INGELHEIM FRANCE

Ingredientes activos:

[0132]

Bacitracina 200 U.I.
(para 65 UI/mg)
Papaina 2 mg
para 30 NK/mg
Clorhidrato de lisozima 5 mg
para 26.000 U FIP / mg: unidades determinadas por medición cinética OD de lisis de bacterias suspendidas en el tampón. La determinación de la unidad fue medida por cambio inducido por lisis en turbiedad de un cultivo bacteriano suspendido en el tampón.

Ingredientes no activos:

[0133]

Excipiente sacarina
Excipiente estearato de magnesio
Aromatizante mentol
Excipiente sorbitol

[0134] Para tratamiento local de infecciones puntuales limitadas a las membranas bucales de la orofaringe. Precaución, si hay indicaciones clínicas de una infección bacteriana general evidentes, se recomienda terapia antibiótica.

Pasta dental:

[0135] La lisozima se puede usar sola o en combinación con otras enzimas o incluso péptidos antimicrobianos. Ejemplos de otras enzimas: glucosa-oxidasa, lactoperoxidasa.

[0136] Una composición de pasta dental típica que incluye lisozima es "Biotene: de Laclede, Inc. 2030 East University Drive, Rancho Dominguez, CA 90220, EE.UU.

Ingredientes

Ingredientes activos

Contiene: lactoperoxidasa (100gm)

Ingredientes inactivos

[0137] Glucosa-oxidasa, lisozima, monofluorofosfato de sodio, sorbitol, glicerina, pirofosfato de calcio, sílice hidratada, xilitol, goma de celulosa, sabor, benzoato sódico, Beta-d-glucosa, tiocianato potásico.

Composición de detergente

[0138] La lisozima de la invención se puede añadir y así convertirse en un componente de una composición de detergente, particularmente en un detergente líquido con un pH de 7 o inferior.

[0139] La composición de detergente de la invención se puede formular por ejemplo como un detergente para ropa de lavado a mano o a máquina que incluya una composición de aditivo de lavado adecuado para el pre-tratamiento de tejidos manchados y una composición de suavizante para la ropa añadido en el aclarado, o se puede formular como una composición de detergente para su uso en operaciones de limpieza generales de superficies dura del hogar, o se puede formular para operaciones de lavado de la vajilla a mano o a máquina.

[0140] En un aspecto específico, la invención proporciona un aditivo de detergente que comprende la lisozima de la invención. El aditivo de detergente al igual que la composición de 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 xilanas, una oxidas, por ejemplo, una lacasa y/o una peroxidasa.

[0141] En general las propiedades de la enzima o enzimas elegidas deberían ser compatibles con el detergente seleccionado, (es decir, pH óptimo, compatibilidad con otros ingredientes enzimáticos y no enzimáticos, etc.), y la enzima o enzimas deberían estar presentes en cantidades eficaces.

Recombinación de ADN (redistribución)

[0142] La secuencia de nucleótidos de SEC ID nº: 1 se puede usar en un proceso de recombinación (o de redistribución) de ADN. Las nuevas secuencias polinucleótidas obtenidas en tal proceso pueden codificar nuevos polipéptidos con actividad de lisozima con propiedades mejoradas, tales como estabilidad mejorada (estabilidad de almacenamiento, termoestabilidad), actividad específica mejorada, pH óptimo mejorado, y/o tolerancia mejorada hacia compuestos específicos.

[0143] La redistribución entre dos o más polinucleótidos de entrada homólogos (polinucleótidos de punto de inicio) implica la fragmentación de los polinucleótidos y la recombinación de los fragmentos, para obtener polinucleótidos de salida (es decir polinucleótidos que han sido sometidos a un ciclo de redistribución) donde un número de fragmentos de nucleótido se cambia en comparación con los polinucleótidos de entrada.

[0144] La recombinación o redistribución de ADN puede ser un proceso (parcialmente) aleatorio donde una biblioteca de genes quiméricos se genera a partir de dos o más genes de inicio. Varios formatos conocidos se pueden utilizar para efectuar este proceso de redistribución o recombinación.

[0145] El proceso puede implicar fragmentación aleatoria de ADN parental seguido de reensamblaje por PCR para nuevos genes en toda su longitud, por ejemplo como se presenta en US5605793, US5811238, US5830721, US6117679. La recombinación in vitro de genes se puede realizar, por ejemplo tal y como se describe en US6159687, WO98/41623, US6159688, US5965408, US6153510. El proceso de recombinación puede tener lugar *in vivo* en una célula viva, por ejemplo como se describe en WO 97/07205 y WO 98/28416.

[0146] El ADN parental se puede fragmentar por tratamiento con ADNasa I o por restricción de digeridos de endonucleasa como describen Kikuchi *et al* (2000a, Gene 236:159-167). La redistribución de dos progenitores se puede realizar por redistribución monocatenaria de ADN parental de los dos padres como se describe en Kikuchi *et al* (2000b, Gene 243:133-137).

[0147] Un método particular de redistribución es seguir los métodos descritos en Crameri *et al*, 1998, Nature, 391: 288-291 and Ness *et al*. Nature Biotechnology 17: 893-896. Another format would be the methods described in US 6159687: Examples 1 and 2.

5 Ejemplos

Ejemplo 1

La clonación de una lisozima GH25 de *Trametes cinnabarina*

[0148] *Trametes cinnabarina* (= *Pycnoporus cinnabarinus*) CBS114004, *Polyporaceae*, *Polyporales*, *Agricomycetidae*, *Basidiomycetes*, *Basidiomycota*. La cepa fue aislada de ramificaciones muertas de *Castananea mollissima*, recogidas del condado de Huairou, Beijing, China, por Wen Ping Wu, Sept 2002. La cepa fue definitivamente identificada como *Trametes cinnabarina* (*Pycnoporus cinnabarinus*) 11 de octubre de 2002, por Wenping Wu. La cepa fúngica fue depositada el 17 de noviembre en el Centraal Bureau voor Schimmelcultures, Uppsalalaan 8, P.O. Box 85167, 3508 AD Utrecht, Países Bajos, bajo el número de registro CBS114004.

Fermentación y huella genética de la enzima:

[0149] La cepa fúngica CBS114004 fue fermentada en dos medios; los medios FG4 y MEX-1 a 25 grados C, 160 r.p.m. durante 6 días. Los fluidos de cultivo fueron evaluados para ensayo de actividad enzimática por ensayo de huella genética de enzima estándar: huella genética de enzima de fluidos de cultivo.

[0150] Huella genética de la enzima: un perfil de actividad enzimática se obtuvo mediante la evaluación del caldo de cultivo en un amplio espectro de ensayos enzimáticos. Se prepararon placas de microtitulación (MT) de 96 pocillos con sustratos y se almacenaron a + 10°C hasta su uso. Se preparan dos variedades diferentes de pH: pH3 y pH7. Se usan los siguientes sustratos: 0,05% de AZCL (sustratos teñidos y reticulados con Mazurine, Megazyme) - amilosa, arabinano, Beta-glucano (cebada), caseína, colágeno, curdlano, dextrano, galactano (patata), galactomanano (algarrobo), He-celulosa, pululano, xilano (avena) y xiloglucano (AZCL-caseína no se puede usar en pH3 y, por lo tanto, se deja fuera de estas placas). Preparación de sustratos: placas de pH3: 0,1 g de cada sustrato de AZCL es disuelto en 100 ml de 0,2M ácido succínico pH3 + 10 ul de TritonX-100 (0,01%), para dar una concentración final de 0,1% de AZCL. Placas de pH7: 0,1 g de cada sustrato de AZCL es disuelto en 50 ml de H2O estéril más 10 ul de TritonX-100 (0,01%). 50 ml de 0,4M MOPS pH 7 se añade a cada 50 ml sustrato de AZCL, para dar un volumen final de 100 ml y una concentración final de 0,2M de tampón, 0,1% de AZCL. Ensayos de actividad de lacasa y lipasa se incluyen y preparan de la siguiente manera:

Lacasa: 35 ml 0,08 mg/ml de color azul celeste Chicago en 0,2 M de tampón de fosfato/borato, pH 9. Lipasa: se prepara una emulsión de alcohol de polivinilo (PVA)/aceite de semilla de soja mezclando una solución al 2% de PVA con aceite de soja 3:1. Emulsionar el aceite usando ULTRA-TURRAX y mezclar 12 ml de la emulsión con 500 ml 0,2M de tampón de acetato de sodio incluyendo 10mM de CaCl2 pH 5,5 y 5 ml 0,2% de solución de violeta cristal. Las placas de MT se preparan utilizando un Multidrop S20 Stacker, Titertek Instruments, Inc., Alabama, y se usan placas de MT de 96 pocillos US. Sterilin. 200 µl de cada sustrato de AZCL y del sustrato de lipasa y 150 µl del sustrato de lacasa se dispensan en pocillos de MT y 30-50 µl de caldo de cultivo se agrega a cada sustrato y se incuba durante la noche a 26 grados Celsius. Las puntuaciones de los resultados se han hecho en los ensayos de la siguiente manera: 0: ninguna actividad, 1: actividad débil, 2: actividad fuerte. El micelio se cosechó a los 6 días, cuando la muestra mostró muchas actividades enzimáticas diferentes y se almacenó por debajo de -80 grados hasta su uso para la construcción de la genoteca de ADNc.

Aislamiento de ARN total:

[0151] Se usó un método de extracción de ARN total por fenozol modificado (Active Motif, Inc).

Materiales:

[0152]

Fenozol de Active motif nº Cat. 2100
Tubos de Eppendorf libres de ribonucleasa, sugerencias
Cloroformo libre de ribonucleasa
Isopropanol libre de ribonucleasa
EtOH al 96% y 70% libre de ribonucleasa
3 M NaOAc pH 5,2 libre de ribonucleasa
Mezcla de fenol-cloroformo
CIA(Cloroformo:isoamilalcohol, 24:1)

[0153] El siguiente material se horneó a 250°C durante 12 horas:

Arena cuarzosa
Cucharas metálicas
Mortero y mano de mortero
Vasos de vidrio de 150 ml

5

[0154] 20ml de Fenozol en un vaso de precipitados de 150 ml de cristal cocido. Micelios conservados (-80°C) se molieron con arena cuarzosa horneada en un mortero y una mano de mortero pre-enfriados bajo nitrógeno líquido. El material molido se transfirió con una cuchara al vaso de precipitados y se mezcló rápidamente para disolver el material congelado en una suspensión gruesa. El vaso de precipitados con el material se transfirió a un baño maría a 50 C durante 15 minutos. El material se transfirió luego a un tubo Oakridge y se añadió 5 ml de cloroformo "libre de ribonucleasa" se añadió. La muestra se agitó luego en vórtex enérgicamente y luego se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Los tubos fueron centrifugados a 12.000g, temperatura ambiente durante 20 minutos y luego la fase superior fue transferida a un nuevo tubo Oakridge. Un volumen igual de mezcla de fenol-cloroformo se añadió y la muestra fue luego agitada en vórtex enérgicamente y centrifugada bajo las mismas condiciones. La muestra (fase superior fue transferida a un tubo nuevo y se añadió un volumen igual de ClA y el paso de vórtex y de centrifugado se repitió pero sólo con un 10 minutos de centrifugado. La fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo y se añadió 6,25 ml de isopropanol, se mezcló y el material se incubó luego a temperatura ambiente durante 15 minutos. Los tubos fueron luego centrifugados a 12.000g durante 30 minutos, 4°C. El sobrenadante se retiró cuidadosamente y 18ml de 70% de etanol se añadió cuidadosamente. Los tubos se centrifugaron durante 5 minutos, 4°C a 12.000g y luego el sobrenadante se retiró y el granulado se secó al aire. El granulado de ARN fue resuspendido en 500µl de agua tratada con DEPC (Dimetilpirocarbonato). Calentamiento a 65°C durante 10 minutos para ayudar en la resuspensión. El ARN total fue almacenado a -80°C hasta más uso.

Producción de ARN enriquecido en poliA:

25

[0155] Se usó el equipo de aislamiento de ARNm mTrap Midi de Active Motif (Active Motif, Europa). El ARN enriquecido en poliA fue purificado según las instrucciones del fabricante con la siguiente modificación: la suspensión de ARN total aislada como se ha descrito anteriormente, se usó como materia prima. 15 ml del tampón de lisis, sin proteasa, se añadió a aproximadamente 20 µg de ARN total.

Las fracciones de ARNm fueron eluidas por cromatografía en columna como se describe en el protocolo y los grupos que representan 0,5 kb y los mayores se eligieron para síntesis de ADNc.

Creación de una genoteca de ADNc:

35

[0156] El equipo de construcción de ADNc inteligente (K1051-1, BD Biosciences) se usó con las siguientes modificaciones: después del paso de síntesis de ADNc de segunda cadena, el material fue purificado por cromatografía de giro GFX según las instrucciones del fabricante (AP Pharma) y el material eluido en 85µl de H₂O desionizada. Después de la digestión de Sfil, el ADNc tratado se fraccionó de tamaño por Purificación de gel EtBr según el siguiente método:

40

1) Preparar un 0,8% de gel de agarosa SeaPlaque LMP en 1 x TBE (en LiChroSolv/HPLC H₂O sometido a autoclave) + ETBr en el gel y tampón. Añadir tampón de carga a 100µl de la digestión de Sfil del paso D y llevar a 15 V en una célula de electroforesis limpia durante toda la noche con marcadores de ADN que flanqueen la muestra.

45

2) En una caja UV y UV de onda larga (360 nm), visualizar el ADNc y los marcadores de ADN. Con un escalpelo eliminar todo el gel por debajo de 500 pares de bases y eliminar la parte superior de los pocillos de muestra. Deslizar el gel restante abajo en la célula y echar un 1,5% de gel de agarosa Seaplaque ETBr sobre los pocillos de muestra.

50

3) Invertir la polaridad de la unidad de electroforesis y llevar el ADN a una distancia corta en el gel de agarosa al 1,5%.

55

4) Realizar la escisión de gel estándar bajo UV de onda larga y purificación GFX del fragmento de gel.

[0157] La muestra se ligó en el vector pMHas5 en una reacción de ligamiento estándar usando T4 ADN-ligasa (New England Biolabs, Inc), según las instrucciones del fabricante. El plásmido pMhas5 y el uso de una genoteca de ADNc fúngico producida en el plásmido se describe en la solicitud de patente WO2003044049. La misma metodología fue usada para identificar la lisozima GH25 de *Trametes* de la biblioteca tratada con el transposón SigA4 como se describe en la WO2003044049. La secuencia, SEC ID 1, fue identificada en el resultado de BLAST original como que tiene fuerte similitud con la glicosil hidrolasa GH25 GENESEQP:AAW85696 de *Streptomyces rutgersensis* y la secuencia fúngica SWISSPROT: P00721 de *Chalaropsis sp.* La secuencia peptídica GH 25 y varias otras peor anotadas de *Streptomyces* abren marcos de lectura a partir de productos de secuenciación genómica (*Streptomyces coelicolor*, Q9FBR0) (véase matriz de homología Tabla 1). Sobre la base de esta información, se decidió expresar el candidato GH 25 de *Trametes* en el *Aspergillus oryzae*.

65

Tabla 1. Tabla de homología de hidrolasas GH25 con puntuación máxima encontradas en bancos de datos públicos

	Chalaropsis	NP001276	AAW85696	Q9FBR0
Chalaropsis	100	60	32	40
NP001276		100	40	53
AAW85696			100	45
Q9FBR0				100
AAW85696, <i>Streptomyces rutgersensis</i> ; Q9FBR0, <i>Streptomyces coelicolor</i> ; NP001276 la GH25 de la invención; Chalaropsis (SWISSPROT:P00721)				

5 Ejemplo 2

Expresión de la enzima GH25 de *Trametes* de la invención:

[0158] La secuencia ID N° 1 se usó para diseñar cebadores oligonucleótidos adaptados para usar en una reacción por PCR para generar un inserto que codifique la enzima de la invención, flanqueado por sitios enzimáticos de restricción que faciliten que clonación en un vector de expresión.

Cebadores:

[0159]

Cebador 1 (SEC ID n° 3), NP1276 EcoRI

5'-GCGGAATTCAACATGAAGCTCTCTACACAGCTC-3'

Cebador 2, (SEC ID n° 4), NP1276 NotI

5'-ATATGCGGCCGCAAAGTTACGAAGCTGCGAATTGTC-3'

[0160] Las partes subrayadas son secuencias de ADN adicionales añadidas a los cebadores para incorporar sitios enzimáticos de restricción usados en la clonación.

[0161] La secuencia de codificación de lisozima GH25 fue amplificada a partir de la genoteca de ADNc anterior (véase ejemplo 1 anterior) de la siguiente manera: 1 microlitro de ADNc (aproximadamente 10 nanogramos de ADN) se usó como modelo en una reacción por PCR con los dos cebadores NP1276EcoRI y NP1276NotI.

NP1276 EcoRI: 5'-GCGGAATTCAACATGAAGCTCTCTACACAGCTC-3' (SEC ID n°: 3)

NP1276 NotI: 5'-ATATGCGGCCGCAAAGTTACGAAGCTGCGAATTGTC-3' (SEC ID n°: 4)

[0162] 10 pmol de cada cebador se usaron en un volumen de reacción de 100 microlitros. La polimerasa ProofStart (Qiagen GMBH) se usó en condiciones recomendadas por el proveedor. Después de un tratamiento térmico inicial de 10 minutos a 94 grados C las condiciones fueron de la siguiente manera: temperatura de desnaturalización: 94 grados Celsius 30 segundos, temperatura de recocimiento: 55 grados Celsius 30 segundos y extensión a 72 grados Celsius durante 1 minuto. Se llevaron a cabo un total de 35 ciclos.

[0163] Partes alícuotas de la reacción por PCR fueron separadas en un gel de agarosa al 1%. Se vio una única banda diferente en los 820 pares de bases predichos. El fragmento fue aislado del gel por cromatografía de giro GFX (AB Phama) y digerido con EcoRI y NotI que fue cortado en las preponderancias introducidas por los cebadores de la PCR. Los fragmentos digeridos fueron aislados y clonados en pXYG1051, un plásmido de expresión de *Aspergillus* basado en el plásmido pMStr46 (véanse los ejemplos de la solicitud de patente internacional WO2003070956). Específicamente, la región de replicación autónoma AMA fue retirada por digestión y relegamiento de HindIII dando como resultado un vector integrador. Después de ligamiento estándar, la transformación en DH10B *E. coli*, las colonias que crecieron bajo selección de ampicilina en placas LB fueron identificadas. 10 colonias fueron elegidas para preparar ADN plásmido. El ADN plásmido resultante fue secuenciado utilizando los cebadores de vector de pXYG1051 revelados en la solicitud de patente WO2003070956. Uno de los clones que estaba sin errores de PCR (NP001276-4) fue elegido para preparación de plásmido de escala Qiagen midi (Qiagen GMBH).

[0164] El clon elegido (NP001276-4) fue usado para la expresión de la enzima en *Aspergillus* (véase más abajo) y el inserto de EcoRI y NotI que comprende el gen de la invención fue usado para la subclonación del fragmento en un vector bacteriano estándar, pBlueScript KS+ (Stratagene Inc.), y transformación en la cepa de *E. coli* DH10B (de

Clontech). Esta cepa fue depositada el 8 diciembre de 2003 en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1 b, D-38124 Braunschweig, Alemania, bajo el número de registro DSM 16084.

Expresión del clon NP001276 en *Aspergillus*:

[0165] El clon de ADNc, NP001276-4, fue transformado en la cepa de *Aspergillus oryzae* Jal355 (descrita en la solicitud de patente internacional WO2003070956). 30 transformantes fueron reaislados dos veces bajo condiciones de no inducción y selectivas en placas mínimas de nitrato de COVE con sacarosa como fuente de carbono. Para probar la expresión de NP1276, transformantes fueron cultivados durante 4 días a 30 grados Celsius en tubos con 10 ml YPM (2% de peptona, 1% de extracto de levadura, 2% de maltosa). Sobrenadantes fueron llevados a NuPage 10% Bis-Tris geles SDS (Invitrogen) como recomendado por el fabricante. Las cepas de *Aspergillus* crecieron bien incluso cuando fueron inducidas para la expresión de plectasina con maltosa. Una banda diferente del tamaño previsto para lisozima GH 25 (23 kDa) fue vista en la mayoría de los transformantes, mientras que esta banda no fue vista en la cepa huésped no-transformada *A. oryzae* BECh2. Un transformante de *Aspergillus* único, fuertemente expresante (EXP00787) fue elegido para estudio continuo. Un experimento de matraz de agitación de gran escala fue realizado con 20 X 1000 ml frascos de agitación Erlingmeyer con tres deflectores. Cada matraz contenía 100 mls de medio FG4P (FG4P: 3% harina de soja (SFK 102-2458), 1,5% maltodextrina (Roquette), 0,5% Pep-ona bacto (Difco 0118), 1,5% de KH₂PO₄ (Merck 4873), 0,2 mls/litro Pluronic PE 6100 (BASF). Condiciones usadas: 30 grados C, 150 r.p.m., 3 días de crecimiento. El fluido de cultivo fue cosechado por filtración a través de dos capas de Miracloth y congelado hasta su uso.

Ejemplo 3

Purificación de la enzima GH25 de la invención:

Descripción de purificación:

[0166] 1,7 l de caldo de fermentación fue filtrado para germen y purificado en una columna de SP-sepharose usando 50mM de NaAc pH 5/ 50mM de NaAc, 1 M de NaCl pH 5. Las fracciones agrupadas fueron concentradas en célula de Amicon (Millipore) con un corte de 10kDa. La secuencia de aminoácidos N-terminal (EK RANPKGID) confirmó que la proteína purificada era la enzima madura GH25.

Ejemplo 4

Detección de actividad de lisozima por un ensayo de pared celular

[0167] Células liofilizadas de *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma) se usaron como sustrato. El sustrato fue suspendido en un tampón Britton&Robinson (0,08 M de ácido fosfórico, 0,08 M de ácido bórico y 0,08 M de ácido acético; pH ajustado a 2-12 con 1 M de NaOH) al pH apropiado en una concentración final de 0,3 mg/ml. A cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillo se le añadió 100µl de suspensión de sustrato y 30µl de solución enzimática en una concentración de aproximadamente 1 mg/ml. Cambios en la turbidez se midieron en un lector de microplacas en 450 nm durante 5 minutos después de añadir la enzima. La pendiente de la curva fue calculada y usada como una medida relativa de actividad enzimática.

[0168] Curva de temperatura: la enzima purificada fue incubada a 40°, 50°, 60° y 70°C durante 15 min. Las muestras fueron enfriadas a temperatura ambiente y la actividad residual relativa a pH 5 fue medida en el ensayo anteriormente mencionado. La enzima fue estable hasta los 50°C.

Tabla 2

Temperatura, °C	Actividad residual relativa, %
40	100
50	98
60	64
70	28

Curva de pH: suspensiones de sustrato a pH 4, 5, 6, 7 y 8 fueron preparadas, y la actividad relativa de la enzima fue medida como se ha descrito anteriormente. La enzima tiene pH óptimo en pH 5.

Tabla 3

pH	Actividad relativa, %
4	35
5	100
6	41
7	20
8	15

5 Depósito de material biológico

[0169] El siguiente material biológico se ha depositado según las condiciones del tratado de Budapest con el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1 B, D-38124 Braunschweig, Alemania, y se le ha dado el siguiente número de registro:

10

Depósito	Número de registro	Fecha de depósito
<i>E. coli</i>	DSM 16084	5 de diciembre de 2003

[0170] El siguiente material biológico se ha depositado según las condiciones del tratado de Budapest con el Centraal Bureau voor Schimmelcultures, Uppsalalaan 8, P.O. Box 85167, 3508 AD Utrecht, Países Bajos, y se le ha dado el siguiente número de registro:

15

Depósito	Número de registro	Fecha de depósito
<i>Trametes cinnabarina</i>	CBS 114004	17 de noviembre de 2003

Listado de secuencias

[0171]

20

<110> Novozymes A/S

<120> Enzima de degradación de la pared celular fúngica

25

<130> 10515.000-DK

<160> 4

<170> Versión de patentIn 3.1

30

<210> 1

<211> 945

<212> ADN

<213> *Trametes cinnabarina*

35

<400> 1

ggccattacg gccgggggtg cacagacgtc ggtgtccgag cacatcctat ctactcaag	60
cttagaccac cttgggctac gacatgaagc tctctaccac agctctgctt gctattgcgg	120
tggcagtggc ctctgcttct cccactcccg agaagcgtgc caacccaag ggcattgacg	180
tctcggctta ccaaccaac atcaactgga gcaccgtcaa agccaacggg atctcgttcg	240
catatatcaa ggcaaccgag ggtaccacgt ataccaaccc agacttctcg agccagtata	300
caggcgcgac taatgctgga ctcatcggg gcggctacca cttcgcccat cccgactcct	360
cttcaggcgc gactcaagcc aagtacttcc tggcccacgg aggtggatgg acaagcgacg	420
gaatcacact tccaggcgct ctcgacatcg agtataaccc tagcggggcg gagtgttatg	480
gcttaagcgc gtcggcgatg gtttcgtgga tcaaagactt ctccaatacc taccactcgt	540
cgaccggagt ttacctgtt atttacacca ccacggactg gtggacgaca tgcacgggca	600
acagtgccgc gtttgcttcg acgaaccctc tatggattgc ccgctatgca tcaagcatcg	660
gcaccctgcc cgcaggttgg agttatacaa cgttctggca atatgctgac tcgggcccga	720
accctggtga ccaggatgag ttcaatggct cgatggcagg actgaagcag cttgcgctcg	780
ggtgaagtgg gatgtgaggt cgccggagaa gaagcagagt ccaccggcag cagtatccgt	840
cgtgtacatc atggtgtcat accatccgaa gacgatactc gagtcgtacg gacaattcgc	900
agcttcgtaa ctttgaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa	945

<210> 2

<211> 233

<212> PRT

<213> *Trametes cinnabarina*

<400> 2

5

Met Lys Leu Ser Thr Thr Ala Leu Leu Ala Ile Ala Val Ala Val Ala
1 5 10 15

Ser Ala Ser Pro Thr Pro Glu Lys Arg Ala Asn Pro Lys Gly Ile Asp
20 25 30

Val Ser Ala Tyr Gln Pro Asn Ile Asn Trp Ser Thr Val Lys Ala Asn
35 40 45
Gly Ile Ser Phe Ala Tyr Ile Lys Ala Thr Glu Gly Thr Thr Tyr Thr
50 55 60

Asn Pro Asp Phe Ser Ser Gln Tyr Thr Gly Ala Thr Asn Ala Gly Leu
65 70 75 80

Ile Arg Gly Gly Tyr His Phe Ala His Pro Asp Ser Ser Ser Gly Ala
85 90 95

Thr Gln Ala Lys Tyr Phe Leu Ala His Gly Gly Gly Trp Thr Ser Asp
100 105 110

Gly Ile Thr Leu Pro Gly Ala Leu Asp Ile Glu Tyr Asn Pro Ser Gly
115 120 125

Ala Glu Cys Tyr Gly Leu Ser Ala Ser Ala Met Val Ser Trp Ile Lys
130 135 140

Asp Phe Ser Asn Thr Tyr His Ser Ser Thr Gly Val Tyr Pro Val Ile
145 150 155 160

Tyr Thr Thr Thr Asp Trp Trp Thr Thr Cys Thr Gly Asn Ser Ala Ala
165 170 175

Phe Ala Ser Thr Asn Pro Leu Trp Ile Ala Arg Tyr Ala Ser Ser Ile
180 185 190

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

Asp Ser Gly Pro Asn Pro Gly Asp Gln Asp Glu Phe Asn Gly Ser Met
210 215 220

Ala Gly Leu Lys Gln Leu Ala Leu Gly
225 230

ES 2 531 753 T3

<212> ADN
<213> Artificial

<220>
5 <223> Cebador PCR arriba para SEC ID nº 1 que tiene un sitio EcoR1 añadido

<400> 3
gcggaattca acatgaagct ctctaccaca gctc 34

10 <210> 4
<211> 36
<212> ADN
<213> Artificial

15 <220>
<223> Cebador PCR abajo para SEC ID nº 1 que tiene un sitio Not1 añadido

<400> 4
atatgcggcc gcaaagttac gaagctgcga attgtc 36

20

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido fúngico que tiene actividad de lisozima y pertenece a la familia GH25 seleccionado del grupo que consiste en:

(a) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos, que tiene al menos 80% de identidad con los aminoácidos 1 a 233 de SEC ID nº: 2;

(b) un polipéptido que es codificado por una secuencia de nucleótidos que hibridiza bajo condiciones de astringencia altas con una sonda polinucleótida que está constituida por la cadena complementaria de los nucleótidos 84 a 782 de SEC ID nº: 1 o

(c) un fragmento de (a) o de (b) que tiene actividad de lisozima;

donde el polipéptido tiene un pH óptimo a pH5.

2. Polipéptido según la reivindicación 1, que incluye una secuencia de aminoácidos, que tiene al menos 85% de identidad con los aminoácidos 1 a 233 de SEC ID nº: 2.

3. Polipéptido según la reivindicación 2, que comprende los aminoácidos 1 a 233 de SEC ID nº: 2.

4. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que consiste en los aminoácidos 1 a 233 de SEC ID nº: 2.

5. Polipéptido según la reivindicación 1, que se codifica por una secuencia de nucleótidos que hibridiza bajo condiciones de astringencia muy altas con una sonda polinucleótida constituida por la cadena complementaria de los nucleótidos 84 a 782 de SEC ID nº: 1.

6. Polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-5.

7. Constructo de ácidos nucleicos que comprende la secuencia de nucleótidos definida en la reivindicación 6 operativamente enlazada a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un huésped adecuado.

8. Vector de expresión recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos según la reivindicación 7.

9. Célula huésped recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos según la reivindicación 7.

10. Método para producir un polipéptido tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende:

(a) cultivo de una cepa, que en su forma de tipo salvaje es capaz de producir el polipéptido, para producir el polipéptido; y

(b) recuperación del polipéptido.

11. Método para producir un polipéptido tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende:

(a) cultivo de una célula huésped recombinante tal y como se define en la reivindicación 9, bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y

(b) recuperación del polipéptido.

12. Polinucleótido según la reivindicación 6 que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 85% de identidad con los nucleótidos 84 a 782 de SEC ID nº: 1.

13. Polinucleótido según la reivindicación 12, que tiene al menos 90% de identidad con los nucleótidos 84 a 782 de SEC ID nº: 1.

14. Polinucleótido que comprende la SEC ID nº: 1.

15. Polinucleótido que consiste en la SEC ID nº: 1.

16. Polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad de lisozima, y que hibridiza bajo condiciones de astringencia altas con una sonda polinucleótida que consiste en la cadena complementaria de los nucleótidos 84 a 782 de SEC ID nº: 1.

17. Polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos modificada que comprende al menos una modificación en la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID nº: 1, y donde la secuencia de nucleótidos modificada codifica un polipéptido que consiste en los aminoácidos 1 a 233 de SEC ID nº: 2.

5 18. Método de redistribución de un ADN que comprende el uso del polinucleótido tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 6 y 12-17.

19. Uso de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 como un inhibidor de formación de biopelícula.

10 20. Uso de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en una composición dental.

21. Uso de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en una composición de detergente.

22. Uso de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en el pienso para animales.

15