

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 958**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/80** (2006.01)

**C12N 9/84** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2011 PCT/EP2011/073275**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.06.2012 WO12080516**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2011 E 11804549 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016 EP 2651969**

54 Título: **Inhibidores y patrones del mal olor**

30 Prioridad:

**17.12.2010 EP 10195789**

**17.12.2010 US 201061424114 P**

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

**17.03.2017**

73 Titular/es:

**BASF SE (100.0%)**

**Carl-Bosch-Strasse 38**

**67056 Ludwigshafen am Rhein, DE**

72 Inventor/es:

**POMPEJUS, MARKUS**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 605 958 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

## Inhibidores y patrones del mal olor

5 La invención se refiere al campo de sistemas de reacción que generan mal olor, particularmente a partir de constituyentes del sudor humano. Específicamente, la invención se refiere a proteínas para generar malos olores, a sustratos para generar tales malos olores, a inhibidores de la generación de tal mal olor y a sistemas de prueba y examen para medir su eficacia de inhibición del mal olor y encontrar sustancias que no se sabía previamente que inhibían la generación de mal olor. Por tanto, la invención también se refiere al campo de los desodorantes.

10 Generalmente se acepta que el sudor humano fresco es inodoro, y que el olor del sudor se genera por microorganismos que colonizan la piel humana y particularmente la axila. Por tanto, el olor generado a partir del sudor humano se considera característico en el sentido de que tras oler tal aroma queda claro inmediatamente que el aroma indica sudor humano. El olor puede considerarse ampliamente y según la presente invención que es un mal olor y puede ser muy pronunciado.

15 Durante años, se ha intentado por tanto inhibir la generación del mal olor del sudor para reducir el mal olor o enmascararlo. En el contexto de la presente invención, "inhibición" designa todos los medios para prevenir la formación del mal olor del sudor a partir del sudor humano, incluyendo medios para ralentizar la generación de tal mal olor. "Reducción" se refiere a medios para tratar los constituyentes del mal olor del sudor para hacerlos menos intensos, por ejemplo uniéndolos a e inmovilizándolos sobre una matriz. "Enmascarar" designa aquellos medios y esfuerzos destinados a afectar a la percepción humana del mal olor del sudor, por ejemplo sobrecargando una nariz humana con otros aromas más intensos y menos malolientes, o reduciendo o alterando de otra forma la capacidad del sistema olfativo humano para detectar uno o más compuestos malolientes del mal olor del sudor.

20 Es deseable inhibir la formación del mal olor del sudor y no solo para reducir o enmascarar tal mal olor. Una manera intentada frecuentemente es la aplicación de antitranspirantes a la axila humana para impedir la formación del sudor. El razonamiento es que si no se forma sudor, no se generará mal olor del sudor. Sin embargo, hay problemas tales como que influir en los procesos psicológicos humanos puede no ser sostenible o conducir a efectos secundarios no deseados. En el contexto de la presente invención "inhibidores" son por tanto sólo aquellas sustancias que son eficaces para ralentizar o impedir la formación de uno o más constituyentes del mal olor del sudor a partir del sudor humano distintas de cualquiera que se basa predominante en la supresión de la formación de secreciones.

25 Por tanto, hay una necesidad general de encontrar inhibidores eficaces de la generación del mal olor del sudor. La búsqueda de tales inhibidores se ve dificultada por el hecho de que se sabe poco acerca de la formación real del mal olor del sudor, particularmente los procesos psicológicos de los microorganismos responsables de la generación del mal olor. Además, hay una falta de procedimientos normalizados para comparar la eficacia de posibles inhibidores de la generación del mal olor.

30 El documento EP 1 387 891 (publicado también como WO 02/092024 A2) da a conocer una N-alfa-acil-glutaminoaminoacilasa aislada implicada según se notifica en la transformación de compuestos precursores inodoros que se encuentran en el sudor en ácidos grasos malolientes. El documento describe además la aplicación de esta enzima en el examen de alto rendimiento para detectar inhibidores.

35 Una desventaja de la enzima dada a conocer en el documento de patente europea anteriormente mencionado y en consecuencia también del sistema de prueba descrito en el mismo es que la enzima requiere como cofactor un ion de zinc y por tanto se ve afectada fácilmente por la presencia de agentes quelantes. Sin embargo, los agentes quelantes de zinc como EDTA no son eficaces para inhibir la generación del mal olor del sudor humano cuando se aplica al sudor humano *in vivo*. Por tanto, el sistema de prueba requiere gran cuidado cuando se preparan los reactivos usados en el mismo, y los posibles inhibidores identificados por el sistema de prueba tienen que reanalizarse para descartar que su efecto inhibidor del mal olor, tal como se determina mediante el sistema de prueba, no sea simplemente un resultado de su interferencia con iones de zinc.

40 Por tanto, era un problema de la presente invención proporcionar un sistema de prueba para reproducir una ruta representativa de la generación del mal olor del sudor que fuese independiente de la presencia de iones de zinc.

## Descripción detallada de la invención

En relación con la invención, se describe por tanto en el presente documento una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene

50 a) una identidad de secuencia de al menos el 93%, preferiblemente al menos el 95%, más preferiblemente de al menos el 98% y lo más preferiblemente del 100%, y/o

b) una similitud de secuencia de al menos el 97%, preferiblemente al menos el 98%, más preferiblemente de al menos el 99% y lo más preferiblemente del 100%,

con una secuencia de aminoácidos según cualquiera de SEQ ID NO 2 a 31, en la que la identidad de secuencia y la similitud de secuencia se calculan según el algoritmo de EMBOSS Needle que tiene una penalización por hueco abierto de 10,0, una penalización por extensión de hueco de 0,5 y usando la matriz Blosum62.

Se ha encontrado que tal proteína puede producir rápidamente el mal olor característico del sudor humano cuando se pone en contacto con sudor humano fresco, no maloliente o débilmente maloliente. Significativamente, se encontró también la capacidad de generar el mal olor del sudor tras poner en contacto la proteína con sudor humano esterilizado.

Incluso más importante, se ha encontrado que la generación del mal olor del sudor humano mediante esta proteína no depende de la presencia de iones de zinc. La proteína también conserva su capacidad para escindir N-alfa-lauroil-L-glutamina para liberar un ácido graso de lauroilo bioquímicamente fácil de detectar y cuantificar incluso en presencia de concentraciones de EDTA suficientes para complejar iones de zinc. La proteína, que se cree que es una enzima, es por tanto útil en un sistema convencional del mal olor y para examinar inhibidores del mal olor del sudor. Incluso más beneficioso, se ha encontrado que la proteína puede tener una alta similitud de secuencia con proteínas que se encuentran en una gran variedad de organismos de diferente género, familia, orden, clase e incluso filo. La proteína es por tanto una representante de un conjunto ubicuo de proteínas de función desconocida hasta ahora que aparecen en una fracción significativa de todos los microorganismos que colonizan la piel humana y particularmente la axila. Por tanto, ha de esperarse que inhibidores eficaces para la inhibición de la formación del mal olor por una proteína de este tipo generalmente serán eficaces para inhibir la formación del mal olor del sudor también cuando se aplican al sudor humano *in vivo* y a la piel humana.

La proteína descrita en el presente documento está disponible preferiblemente en forma aislada. "Aislado" en el contexto de la presente invención designa que la proteína se retira de su entorno original y particularmente no está contaminada con otro material de microorganismos útil en la producción de la proteína. Incluso más preferiblemente, la proteína está en forma purificada, lo que significa que el contenido de la proteína en una composición en relación con otras proteínas o péptidos que tienen una longitud de al menos 10 aminoácidos y en relación con ácidos nucleicos es de al menos el 80% en peso, más particularmente al menos el 90% en peso, todavía más particularmente el 95% en peso y lo más particularmente el 99% en peso o mayor.

La proteína, preferiblemente en forma aislada e incluso más preferiblemente en forma purificada, comprende una secuencia de aminoácidos que tiene la identidad de secuencia y/o similitud de secuencia anterior con una secuencia de aminoácidos según cualquiera de SEQ ID NO 2 a 31. La identidad de secuencia y similitud de secuencia en el contexto de la presente invención se determinan según el algoritmo EMBOSS "Needle". Este algoritmo es el algoritmo convencional para alineaciones de secuencias de aminoácidos por parejas que cubren la longitud completa de ambas secuencias. El algoritmo implementa el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman S.B. y Wunsch C.D., 1970 J. Mol. Biol. 48, 443 - 453), en el que una penalización por un hueco de n posiciones se calcula según la fórmula

$$\text{penalización por apertura de hueco} + (n-1) \times \text{penalización por extensión de hueco}$$

Se alinea la longitud total de cada secuencia de aminoácidos, y no hay penalización para extremos colgantes del solapamiento.

Penalización por hueco abierto en el contexto de la presente invención es de 10,0. La penalización por extensión de hueco en el contexto de la presente invención es de 0,5. La matriz de puntuación para comparar similitudes de aminoácidos en el contexto de la presente invención es la matriz "Blosum62". La penalización por hueco abierto, penalización por extensión de hueco y matriz Blosum62 parámetros convencionales usados en la técnica. Pueden hacerse alineaciones de secuencias con estos parámetros, por ejemplo por medio de herramientas libres disponibles públicamente. Por ejemplo, el EBI ofrece un servicio de alineación de secuencias por parejas con los parámetros de la presente invención por medio de su surtido de herramientas de Internet.

La proteína descrita en el presente documento, particularmente en una forma aislada o purificada, puede consistir en cualquiera de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO 2 a 31, en la que opcionalmente falta la metionina N-terminal. Las proteínas que tienen estas secuencias de aminoácidos sin ninguna modificación o aminoácido añadido adicional pueden particularmente generar el mal olor intenso y típico cuando se ponen en contacto con sudor humano esterilizado inodoro. En el contexto de la presente invención, esterilizado significa que el sudor se filtra mediante filtración estéril, tal como conocen los expertos en la técnica, en particular que tiene un punto de corte de filtración de 0,4 µm.

La proteína descrita en el presente documento, preferiblemente en forma aislada o purificada, preferiblemente

comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO 3, incluso más preferiblemente según SEQ ID NO 4. Se ha encontrado que estas proteínas son particularmente útiles para generar un mal olor fuerte y típico del sudor humano cuando se ponen en contacto con sudor humano fresco esterilizado, inodoro. Según la presente invención la intensidad y el aroma del mal olor del sudor generado se clasifican mediante un panel de expertos de 10 expertos en olor entrenados, clasificándose la intensidad y el aroma en una escala de 0 (no detectable) a 9 (muy intenso/muy típico). Tal evaluación es común en la técnica de análisis del olor.

Se ha encontrado particularmente que proteínas que comprenden isoleucina en la posición 216 y prolina en la posición 219 de SEQ ID NO 3, por ejemplo proteínas de SEQ ID NO 4, pueden producirse fácilmente de manera biotecnológica y pueden producir el mal olor del sudor fuerte y típico cuando se ponen en contacto con sudor humano esterilizado fresco. Por tanto se prefiere que la proteína descrita en el presente documento comprenda o consista en una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO 2 o en una secuencia según cualquiera de SEQ ID NO 5 a 31.

Entre éstas, se prefiere particularmente una proteína descrita en el presente documento que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 2. Esta proteína se ha aislado de una cepa de *Bacillus subtilis* y se encontró particularmente que producía rápidamente un mal olor fuerte y típico cuando se ponía en contacto con sudor humano esterilizado fresco, siendo tal sudor, tal como se indicó anteriormente, esencialmente inodoro en su estado fresco y esterilizado.

La proteína descrita en el presente documento, particularmente la proteína aislada o purificada que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos según cualquiera de SEQ ID NO 2 a 31, preferiblemente no escinde la amida del ácido 3-metil-2-hexénico ni la amida del ácido 3-metil-2-hidroxi-hexanoico sino que escinde N-alfa-lauroil-L-glutamina. Tal como se comentó anteriormente, la escisión de N-alfa-lauroil-L-glutamina por la proteína es independiente de la presencia de iones de zinc.

En relación con la invención, se describe además un ácido nucleico aislado que codifica para una proteína descrita en el presente documento, es decir una proteína que tiene a) una identidad de secuencia de al menos el 93%, preferiblemente al menos el 95%, más preferiblemente de al menos el 98%, y/o b) una similitud de secuencia de al menos el 97%, preferiblemente al menos el 98%, más preferiblemente de al menos el 99%, con una secuencia de aminoácidos según cualquiera de SEQ ID NO 2 - 31 tal como se definió anteriormente. El ácido nucleico preferiblemente comprende o consiste en una secuencia de bases según SEQ ID NO 32 o SEQ ID NO 33. La secuencia de nucleótidos según SEQ ID NO 32 está particularmente adaptada para producir la proteína de SEQ ID NO 2 en *Bacillus subtilis*; el ácido nucleico que comprende la secuencia de bases según SEQ ID NO 33 está particularmente adaptada para producir la proteína de SEQ ID NO 2 en *E. coli* K12. El experto entiende que los ácidos nucleicos descritos en el presente documento también comprenden ácidos nucleicos que codifican para la proteína que consiste en SEQ ID NO 2 optimizados para su expresión por otros microorganismos distintos de *Bacillus subtilis* y *E. coli* K12, en los que tal optimización es según la preferencia de codones respectiva del microorganismo para cada aminoácido respectivo.

El ácido nucleico descrito en el presente documento permite por tanto producir una proteína descrita en el presente documento de manera biotecnológica, para facilitar la proporción de tal proteína de manera reproducible y en cantidades suficientes.

Para este fin, en relación con la invención también se describe en el presente documento un vector de expresión, que comprende un ácido nucleico descrito en el presente documento operativamente unido a un promotor. Y una célula huésped, preferiblemente una célula de *E. coli* célula o una célula de *Bacillus subtilis*, que comprende un ácido nucleico que codifica para una proteína descrita en el presente documento, en la que la célula huésped se transforma preferiblemente con un vector de expresión descrito en el presente documento, también se describe en el presente documento. El vector de expresión en la célula huésped puede estar separado de o insertado (preferiblemente de manera estable) en el genoma de la célula huésped.

Tal producción biotecnológica de proteínas mediante expresión génica recombinante también ofrece la posibilidad de añadir etiquetas N-terminales y/o C-terminales a la proteína. Tales etiquetas comprenden etiquetas como por ejemplo etiquetas de His o etiquetas de Strep u otras etiquetas y las conocen bien los expertos en la técnica. Una ventaja particular de tales etiquetas es la fácil purificación de la proteína respectiva usando sistemas de cromatografía de afinidad específicos. Estos protocolos de purificación los conocen bien los expertos en la técnica. La purificación de proteínas con etiquetas de His sobre resinas funcionalizadas con Ni-NTA o Ni-IDA es de particular ventaja, ya que tales resinas están disponibles fácilmente (por ejemplo de GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Otra ventaja de las etiquetas de His unidas a las proteínas descritas en el presente documento es la no interferencia de la etiqueta de His con la actividad enzimática de la enzima y su uso según esta invención. De este modo, una etiqueta de purificación de este tipo podría usarse para ayudar a la purificación de proteínas, en el caso de que sea beneficioso.

Por otro lado, el experto en la técnica sabe que tales etiquetas podrían interferir con la eficacia de producción de

proteínas y/o actividad enzimática específica. Tal como se observa en la figura 35, esto sucedió en este caso también: la actividad enzimática total en el cultivo celular para la proteína etiquetada con His es inferior que para la proteína sin etiqueta de His.

5 Esto ofrece una posibilidad ventajosa particular de o bien producir mayores cantidades de proteína para mayores demandas, como para grandes números de pruebas (por ejemplo para el examen de grandes números de posibles inhibidores) o bien la producción de proteína purificada para pruebas bioquímicas detalladas (como por ejemplo la determinación de la cinética de la enzima, constantes de unión del inhibidor, etc.)

10 En vista del problema anterior de la presente invención, se proporciona una composición patrón del mal olor según las reivindicaciones de la patente adjuntas. Las composiciones patrón del mal olor de la presente invención son particularmente útiles para generar un mal olor fuerte y típico del sudor humano cuando se ponen en contacto con sudor humano fresco y, antes de dicho contacto, esencialmente inodoro. Una ventaja particular de tales composiciones patrón del mal olor según la presente invención es que no son dependientes de la presencia de iones de zinc en la composición patrón del mal olor o en el sudor. Las composiciones patrón del mal olor de la presente invención permiten por tanto estudiar e influir en la generación de un mal olor muy típico del sudor humano en 15 condiciones reproducibles, eliminando sustancialmente factores como superficie cutánea variable o temperaturas del sudor de personas de prueba.

20 Las composiciones patrón del mal olor según la presente invención son particularmente adecuadas para encontrar y someter a prueba la eficacia de sustancias que influyen en la generación, la intensidad y el "aroma" del mal olor del sudor. Esto puede lograrse añadiendo una sustancia candidata para modificar la velocidad, intensidad o "aroma" del mal olor del sudor a una composición patrón del mal olor de la presente invención que entonces se pone en contacto con el sudor humano, particularmente con sudor humano fresco y preferiblemente esterilizado. Además, la sustancia candidata puede añadirse al sudor, sudor particularmente fresco y preferiblemente esterilizado que entonces se pone en contacto con una composición patrón del mal olor de la presente invención.

25 La composición patrón del mal olor puede comprender una proteína aislada que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene

a) una identidad de secuencia de al menos el 93%, preferiblemente al menos el 95%, más preferiblemente de al menos el 98% y/o

b) una similitud de secuencia de al menos el 97%, preferiblemente al menos el 98%, más preferiblemente de al menos el 99%,

30 con una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO 1, en la que la identidad de secuencia y similitud de secuencia se calculan según el algoritmo EMBOSS Needle que tiene una penalización por hueco abierto de 10,0, una penalización por extensión de hueco de 0,5 y usando la matriz Blosum62. La secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 1 se conoce de *Bacillus subtilis*. Sin embargo, no se conocía que tal proteína, cuando se pone en contacto con sudor humano inodoro, puede producir mal olor del sudor intenso y típico. La proteína es por tanto útil también en 35 composiciones patrón del mal olor de la presente invención.

40 La composición patrón del mal olor de la presente invención comprende preferiblemente una proteína que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos según cualquiera de SEQ ID NO 1 a 31, preferiblemente que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO 2 o cualquiera de SEQ ID NO 5 a 31. Se prefieren particularmente tales composiciones patrón del mal olor en la que la proteína para generar mal olor del sudor consiste en una proteína purificada que consiste en cualquiera de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO 1 a 31, de manera particularmente preferible SEQ ID NO 2 o de 5 a 31, y lo más preferiblemente de SEQ ID NO 2.

Por tanto, según la presente invención se proporciona una composición patrón del mal olor que consiste en

45 - una proteína aislada o purificada que consiste en cualquiera de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO 1, 2 a 31,

- N-alfa-lauroil-L-glutamina

- y un portador.

50 El portador es preferiblemente un portador líquido y lo más preferiblemente es un tampón acuoso ajustado a un pH de > 4, incluso más preferiblemente de 5 a 9 y lo más preferiblemente de 6,2 a 7,8. Se prefiere particularmente que tal tampón sea un tampón hecho de agua, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM y NaCl 50 mM. Tal portador es fácil de producir de manera reproducible y en cantidades suficientes.

5 En relación con la invención, también se describe una composición de inhibición del mal olor. La composición de inhibición del mal olor comprende una composición patrón del mal olor según la presente invención y un posible inhibidor de la reacción de escisión para un producto maloliente de manera que la composición de inhibición del mal olor permite someter a prueba fácilmente y de manera reproducible de un modo normalizado la eficacia de un posible inhibidor del mal olor del sudor.

La composición de inhibición del mal olor por tanto comprende

- una proteína preferiblemente aislada o purificada que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos según cualquiera de SEQ ID NO 1, 2 a 31,

- N-alfa-lauroil-L-glutamina y

10 - un portador para permitir la escisión de N-alfa-L-lauroil-L-glutamina por la proteína en ausencia de un inhibidor, y  
- el inhibidor candidato.

Incluso más preferiblemente, la composición de inhibidor del mal olor consiste en

- una proteína aislada o purificada que consiste en la secuencia de aminoácidos según cualquiera de SEQ ID NO 1, 2, 5 a 31,

15 - N-alfa-lauroil-L-glutamina,

- un portador para permitir la escisión de N-alfa-L-lauroil-L-glutamina por la proteína en ausencia de un inhibidor, y

- un inhibidor candidato.

En la composición de inhibición del mal olor, el portador es preferiblemente una disolución, en agua, de NaCl 50 mM y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  50 mM a pH 7.

20 La presente invención proporciona además un sistema de examen de inhibidores del mal olor, que comprende una proteína, preferiblemente aislada, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene

a) una identidad de secuencia de al menos el 93%, preferiblemente al menos el 95%, más preferiblemente de al menos el 98%, y/o

25 b) una similitud de secuencia de al menos el 97%, preferiblemente al menos el 98%, más preferiblemente de al menos el 99%,

con una secuencia de aminoácidos según cualquiera de SEQ ID NO 1 a 31, en la que la identidad de secuencia y similitud de secuencia se calculan según el algoritmo EMBOSS Needle que tiene una penalización por hueco abierto de 10,0, una penalización por extensión de hueco de 0,5 y usando la matriz Blosum62,

30 - junto con una sustancia que puede escindirarse por la proteína para generar un producto maloliente en condiciones que permiten tal escisión, concretamente N-alfa-lauroil-L-glutamina, y

- un conjunto de sustancias candidatas a inhibidores que van a examinarse.

35 El sistema de examen de inhibidores del mal olor comprende por tanto preferiblemente una máquina que realiza las etapas de hacer reaccionar la proteína y la sustancia escindible en presencia de una sustancia candidata a inhibidor seleccionada en condiciones que, en ausencia de un inhibidor eficaz, permiten la escisión de la sustancia escindible para generar un producto maloliente.

También para los beneficios comentados anteriormente la proteína es preferiblemente una proteína aislada o purificada.

40 Se prefiere particularmente un sistema de examen de inhibidores del mal olor de la presente invención, en el que la proteína es una proteína aislada o purificada que consiste en una secuencia de aminoácidos según cualquiera de SEQ ID NO 1, 2 a 31 y lo más preferiblemente es una proteína purificada que consiste en una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO 2.

Las condiciones que permiten tal escisión incluyen preferiblemente la presencia de un tampón acuoso que comprende NaCl 50 mM y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM a pH 7.

En resumen, se prefiere particularmente un sistema de examen de inhibidores del mal olor que comprende

- una proteína purificada que consiste en la secuencia de aminoácidos según cualquiera de SEQ ID NO 1, 2, 3 a 31,

5 - N-alfa-lauroil-L-glutamina,

- un tampón acuoso de NaCl 50 mM y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM a pH 7,

- una serie de sustancias candidatas a inhibidor, y

- un sistema automático para mezclar la proteína, N-alfa-lauroil-L-glutamina y una o más sustancias candidatas a inhibidor en el tampón.

10 Tal sistema de examen de inhibidores del mal olor está particularmente adaptado a usarse en aplicaciones de examen de alto rendimiento para someter a prueba la eficacia de un gran surtido de posibles sustancias inhibidoras en concentraciones variables. El sistema de examen de inhibidores del mal olor de la presente invención ayuda por tanto ventajosamente en la identificación de inhibidores del mal olor del sudor útiles adicionales. El sistema incluye además las ventajas que presentan la proteína y la composición patrón del mal olor de la presente invención,  
15 particularmente que la generación del mal olor es independiente de iones de zinc.

De nuevo, la formación del mal olor y la inhibición de la formación del mal olor pueden analizarse y cuantificarse por un panel de expertos tal como se indicó anteriormente. También se prefiere y es particularmente útil en aplicaciones de alto rendimiento, sin embargo, es un sistema según la presente invención en el que la sustancia que va a escindirse y/o un producto de tal reacción de escisión se detecta automáticamente, por ejemplo mediante  
20 cromatografía de gases u ópticamente por medio de fotometría, fotometría de fluorescencia o luminiscencia-fotometría tras la adición de reactantes adicionales. Tales medios para la detección los conoce el experto en la técnica, por ejemplo del ejemplo 8 del documento EP 1387891 B1.

Por consiguiente, también se describe en el presente documento un método que puede normalizarse de generación de un mal olor, que comprende la etapa de hacer reaccionar una proteína que comprende o consiste en una  
25 secuencia de aminoácidos que tiene

a) una identidad de secuencia de al menos el 93%, preferiblemente al menos el 95%, más preferiblemente de al menos el 98%, y/o

b) una similitud de secuencia de al menos el 97%, preferiblemente al menos el 98%, más preferiblemente de al menos el 99%,

30 con una secuencia de aminoácidos según cualquiera de SEQ ID NO 1 a 31, en el que la identidad de secuencia y similitud de secuencia se calculan según el algoritmo EMBOSS Needle que tiene una penalización por hueco abierto de 10,0, una penalización por extensión de hueco de 0,5 y usando la matriz Blosum62,

- con una sustancia escindible mediante esta proteína en condiciones que permiten que tal escisión produzca un mal olor, en el que la sustancia es preferiblemente N-alfa-lauroil-L-glutamina.

35 El método se realiza preferiblemente en sudor humano fresco y esterilizado, o en un tampón acuoso de NaCl 50 mM y tampón NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM a pH 7.

La proteína consiste preferiblemente en una secuencia de aminoácidos según cualquiera de SEQ ID NO 1 a 31, preferiblemente según cualquiera de SEQ ID NO 1, 2, 5 a 31 y lo más preferiblemente según SEQ ID NO 2.

40 Además, la invención proporciona un método de examen para inhibidores del mal olor, comprendiendo el método las etapas de

1. incubar una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene

a) una identidad de secuencia de al menos el 93%, preferiblemente al menos el 95%, más preferiblemente de al menos el 98%, y/o

b) una similitud de secuencia de al menos el 97%, preferiblemente al menos el 98%, más preferiblemente de al

menos el 99%,

con una secuencia de aminoácidos según cualquiera de SEQ ID NO 1 a 31, en el que la identidad de secuencia y similitud de secuencia se calculan según el algoritmo EMBOSS Needle que tiene una penalización por hueco abierto de 10,0, una penalización por extensión de hueco de 0,5 y usando la matriz Blosum62,

5 - junto con una sustancia escindible por la proteína en condiciones que permiten tal reacción de escisión en ausencia de un inhibidor, concretamente N-alfa-lauroil-L-glutamina, y

- una sustancia candidata a inhibidor para inhibir potencialmente la reacción de escisión, y

2. medir la generación del mal olor.

10 La invención se describe además mediante referencia a los ejemplos y las figuras. No debe entenderse que estos ejemplos limitan el alcance de las reivindicaciones.

### Ejemplos

#### **Ejemplo 1: Amplificación del gen *yxeI* mediante PCR y clonación en vectores de expresión de *E. coli*.**

15 Se usó ADN genómico de una cepa de *Bacillus subtilis*, aislado del sobaco humano como molde para la amplificación por PCR. Se usaron los cebadores directo (5'-GGGACTGATCATATGTGCACAAGTCTTAC-3') e inverso (5'-ATTGAGGATCCTTAATTAAGCTCATGAATACTCT-3') para la amplificación por PCR.

20 Se trató el producto de PCR resultante con las endonucleasas de restricción NdeI y BamHI (New England Biolabs, Frankfurt, Alemania) según las instrucciones del fabricante y se clonó en los plásmidos pET24a (Merck, Darmstadt, Alemania) y pET28a (Merck, Darmstadt, Alemania). Los vectores de expresión resultantes se denominaron pET24a::yxeI o pET28a::yxeI. Contienen un ácido nucleico que codifica para una proteína de SEQ ID NO 1. En el vector pET28a, la proteína está unida a una etiqueta de His de 6 aminoácidos histidina consecutivos.

#### **Ejemplo 2: Expresión génica y producción de proteínas en *E. coli***

25 Se usó *E. coli* BL21(DE3) como huésped de expresión. Se hicieron crecer las cepas (o bien sin plásmido o bien portando los vectores de expresión descritos en el ejemplo 1) a 37°C en 100 ml de medio de Luria-Bertani usando matraces de agitación de 250 ml con agitación vigorosa. Se hicieron crecer cepas que contenían plásmido en presencia de medio de Luria-Bertani que contenía kanamicina 30 mg/l. Después de que la densidad celular alcanzara una DO600 de 1, se añadió IPTG hasta una concentración final de 0,1 mM, seguido por incubación adicional en condiciones idénticas durante otras 2 horas.

30 Se tomaron muestras de 1,5 ml de los cultivos, se recogieron las células mediante centrifugación y se analizaron mediante SDS-PAGE seguido por tinción de Coomassie. Se observó una fuerte expresión génica y producción de proteínas tras la inducción, tal como se muestra mediante la figura 34.

#### **Ejemplo 3: Determinación de la actividad enzimática y prueba para detectar efectos inhibidores.**

35 Se recogieron células obtenidas como en el ejemplo 2 mediante centrifugación y se lavaron dos veces con tampón PBS para eliminar componentes residuales del medio. Se resuspendió el sedimento celular final en tampón PBS (por litro de agua: 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,24 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) hasta alcanzar una DO600 final de 30. Se usó esta suspensión celular de cepas (o bien sin plásmido o bien portando los vectores de expresión descritos en el ejemplo 1) para las pruebas de actividad. Se pusieron en contacto las suspensiones celulares lavadas en tampón PBS con N-alfa-lauril-glutamina (concentración final de 0,2 mg/ml, "LG" en la figura 35), a 37°C (volumen final de 0,25 ml) durante 15 min. Se realizó la prueba real tal como se describe en el ejemplo 7 del documento WO 02/092024 A2, con CG como método de prueba. La cepa libre de plásmido mostró algo de actividad de fondo, mientras que las cepas que portan los vectores de expresión mostraron una fuerte actividad enzimática, tal como puede observarse en la figura 35. Esta figura presenta la actividad enzimática en relación con la actividad de la enzima de la presente invención expresada en pET 24a. Como observación secundaria, la puesta en contacto de esta enzima con el sudor humano fresco da como resultado el desarrollo de un olor intenso del sudor humano.

45 Como prueba de la inhibición de la actividad, se añadió acetato de sodio a un conjunto de muestras hasta una concentración final de 100 mM. Como resultado, se inhibió la actividad enzimática hasta el nivel de la actividad de fondo de la cepa de *E. coli* libre de plásmido.

Se repitió el ensayo con enzimas que tenían una secuencia de aminoácidos según SEQ ID NO 2, 5 a 31,



respectivamente. Todas las enzimas produjeron asimismo un olor intenso del sudor humano cuando se pusieron en contacto con sudor humano fresco, inodoro.

**REIVINDICACIONES**

1. Composición patrón del mal olor, que comprende

- una proteína, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene

5 a) una identidad de secuencia de al menos el 93%, preferiblemente al menos el 95%, más preferiblemente de al menos el 98%, y/o

b) una similitud de secuencia de al menos el 97%, preferiblemente al menos el 98%, más preferiblemente de al menos el 99%,

10 con una secuencia de aminoácidos según cualquiera de SEQ ID NO 1 a 31, en la que la identidad de secuencia y similitud de secuencia se calculan según el algoritmo EMBOSS Needle que tiene una penalización por hueco abierto de 10,0, una penalización por extensión de hueco de 0,5 y usando la matriz Blosum62,

- junto con una sustancia escindible por la proteína para generar un producto maloliente en condiciones que permiten tal escisión, en la que la sustancia escindible es N-alfa-lauroil-L-glutamina.

15 2. Composición de inhibición del mal olor, que comprende una composición patrón del mal olor según la reivindicación 1 y un inhibidor de la reacción de escisión para generar un producto maloliente en condiciones que permiten tal escisión en ausencia de dicho inhibidor.

3. Sistema de examen de inhibidores del mal olor, que comprende

- una proteína, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene

a) una identidad de secuencia de al menos el 93%, preferiblemente al menos el 95%, más preferiblemente de al menos el 98%, y/o

20 b) una similitud de secuencia de al menos el 97%, preferiblemente al menos el 98%, más preferiblemente de al menos el 99%,

con una secuencia de aminoácidos según cualquiera de SEQ ID NO 1 a 31, en el que la identidad de secuencia y similitud de secuencia se calculan según el algoritmo EMBOSS Needle que tiene una penalización por hueco abierto de 10,0, una penalización por extensión de hueco de 0,5 y usando la matriz Blosum62,

25 - junto con una sustancia escindible por la proteína para generar un producto maloliente en condiciones que permiten tal escisión, en el que la sustancia escindible es N-alfa-lauroil-L-glutamina,

- y un conjunto de sustancias candidatas a inhibidor que van a examinarse.

4. Método de examen para detectar inhibidores del mal olor, que comprende las etapas de

1) incubar

30 - una proteína, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene

a) una identidad de secuencia de al menos el 93%, preferiblemente al menos el 95%, más preferiblemente de al menos el 98%, y/o

b) una similitud de secuencia de al menos el 97%, preferiblemente al menos el 98%, más preferiblemente de al menos el 99%,

35 con una secuencia de aminoácidos según cualquiera de SEQ ID NO 1 a 31, en el que la identidad de secuencia y similitud de secuencia se calculan según el algoritmo EMBOSS Needle que tiene una penalización por hueco abierto de 10,0, una penalización por extensión de hueco de 0,5 y usando la matriz Blosum62,

- junto con una sustancia escindible por la proteína para generar un producto maloliente en condiciones que permiten tal escisión, en el que la sustancia escindible es N-alfa-lauroil-L-glutamina,

40 - y una sustancia candidata a inhibidor, y

2) medir la generación del mal olor.

5. Uso de una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene

a) una identidad de secuencia de al menos el 93%, preferiblemente al menos el 95%, más preferiblemente de al menos el 98%, y/o

5 b) una similitud de secuencia de al menos el 97%, preferiblemente al menos el 98%, más preferiblemente de al menos el 99%,

10 con una secuencia de aminoácidos según cualquiera de SEQ ID NO 2 a 31, en el que la identidad de secuencia y similitud de secuencia se calculan según el algoritmo EMBOSS Needle que tiene una penalización por hueco abierto de 10,0, una penalización por extensión de hueco de 0,5 y usando la matriz Blosum62 en una composición patrón del mal olor para generar un producto maloliente.

6. Uso según la reivindicación 5, en el que la secuencia de aminoácidos de la proteína comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos según cualquiera de SEQ ID NO 2 a 31, en el que falta opcionalmente la metionina N-terminal.

15 7. Uso según las reivindicaciones 5 ó 6, en el que la proteína no escinde la amida del ácido 3-metil-2-hexénico ni la amida del ácido 3-metil-2-hidroxi-hexanoico sino que escinde N-alfa-lauroil-L-glutamina.

8. Uso de una proteína, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene

a) una identidad de secuencia de al menos el 93%, preferiblemente al menos el 95%, más preferiblemente de al menos el 98%, y/o

20 b) una similitud de secuencia de al menos el 97%, preferiblemente al menos el 98%, más preferiblemente de al menos el 99%,

con una secuencia de aminoácidos según cualquiera de SEQ ID NO 1 a 31, en el que la identidad de secuencia y similitud de secuencia se calculan según el algoritmo EMBOSS Needle que tiene una penalización por hueco abierto de 10,0, una penalización por extensión de hueco de 0,5 y usando la matriz Blosum62, para examinar un inhibidor de la generación del mal olor.

25 9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que la proteína es una proteína aislada o purificada que consiste en una secuencia de aminoácidos según cualquiera de SEQ ID NO 1 a 31, preferiblemente según cualquiera de SEQ ID NO 1, 2, 5-31, y lo más preferiblemente según SEQ ID 2.

## ES 2 605 958 T3

SEQ ID NO 1

```
MCTSLLTLETA DRKHVLLARTM DFAFQLGTEV ILYPRRYSWN SEADGRAHQ T QYAFIGMGRK
LGNILFADAF NESGLSCAAL YFPGYAEYEK MIREDTVHIV PHEFVTWVLS VCQSLEDVKE
KIRSLTIVEK KDLLLDTVLP LHWILSDRTG RNLTI EPRAD GLKVYDNQPG VMTNSPDFIW
HVTNLQQYTG IRPKQLESKE MGGLALS AFG QGLGTVGLSG DYT PPSRFVR AVYLKEHLEP
AADETKGVTA AFQILANMTI PKGAVITEED EIHYTQYTSV MCNETGNYYF HHYDNRQIQK
VNLFHEDLDC LEPKVFS AKA EESIHEL N
```

Fig.1

SEQ ID NO 2

```
MCTSLLTLETA DRNHLLARTM DFAFQLGTEV ILYPRRYNWM SEADGKAHQ T QYAFIGMGRK
LGNILFADGI NENGLSCAAL YFPGYAEYEK TIQEATVHIA PHEFVTWALS SCKSLEDVKE
KMRSLTIVEK KDLLLDTVLP LHWILSDRTG RSLTIEPRAE GLKVYDNQPG VMTNSPDFIW
HVTNLQQYTG IRPKQLESKE MGGLALS AFG QGLGTIGLPG DYT PPSRFVR AVYLKEHLEP
AADETKGVTA AFQLLANMTV PKGAVITEKD EIHYTQYTSV MCNDTGNYYF HLYDNRQIQK
VNLFHEDLDR LEPKVFS AKA EESIHEL N
```

Fig. 2

ES 2 605 958 T3

SEQ ID NO 3  
M C T S L T L E T A  
D R K/N/R/Q H L/V L A R T M  
D F A F Q L G T E V  
I L Y P R R Y N/S/Q/T/C W M/N/Q  
S E A D G K/R A H Q T  
Q Y A F I G M G R K  
L G N I L F A D A/G F/I/L  
N E N/S/Q/T/C G L S C A A L  
Y F P G Y A E Y E K  
M/T I Q/R E A/D/S T V H I A/V  
P H E F V T W A/V L S  
S/V C K/Q S L E D V K E  
K I/M/L R S L T I V E K  
K L D L L D T V L P  
L H W I L S D R T G  
R N/S/Q/T/C L T I E P R A D/E  
G L K V Y D N Q P G  
V M T N S P D F I W  
H V T N L Q Q Y T G  
I R P K Q L E S K E  
M G G L A L S A F G  
Q G L G T V G L P G  
D Y T P P S R F V R  
A V Y L K E H L E P  
A A D E T K G V T A  
A F Q I/L/V L A N M T I/V/L  
P K G A V I T E E/K D  
E I H Y T Q Y T S V  
M C N D/E T G N Y Y F  
H H/L Y D N R Q I Q K  
V N L F H E D L D C/R/K  
L E P K V F S A K A  
E E S I H E L N

Fig. 3

ES 2 605 958 T3

SEQ ID NO 4  
M C T S L T L E T A  
D R K / N H L / V L A R T M  
D F A F Q L G T E V  
I L Y P R R Y N / S W M / N  
S E A D G K / R A H Q T  
Q Y A F I G M G R K  
L G N I L F A D A / G F / I  
N E N / S G L S C A A L  
Y F P G Y A E Y E K  
M / T I Q / R E A / D T V H I A / V  
P H E F V T W A / V L S  
S / V C K / Q S L E D V K E  
K I / M R S L T I V E K  
K L D L L D T V L P  
L H W I L S D R T G  
R N / S L T I E P R A D / E  
G L K V Y D N Q P G  
V M T N S P D F I W  
H V T N L Q Q Y T G  
I R P K Q L E S K E  
M G G L A L S A F G  
Q G L G T I / V G L P / S G  
D Y T P P S R F V R  
A V Y L K E H L E P  
A A D E T K G V T A  
A F Q I / L L A N M T I / V  
P K G A V I T E E / K D  
E I H Y T Q Y T S V  
M C N D / E T G N Y Y F  
H H / L Y D N R Q I Q K  
V N L F H E D L D C / R  
L E P K V F S A K A  
E E S I H E L N

Fig. 4

SEQ ID NO 5  
MCTSLTLETA DRKHELLARTM DFAFQLGTEV ILYPRRYNWM SEADGKAHQ T QYAFIGMGRK  
LGNILFADGI NENGLSCAAL YFPGYAEYEK TIQEATVHIA PHEFVTWALS SCKSLEDVKE  
KMRSLTIVEK KLDLLDTVLP LHWILSDRTG RSLTIEPRAE GLKVYDNQPG VMTNSPDFIW  
HVTNLQQYTG IRPKQLESKE MGGLALS AFG QGLGTIGLPG DYTPPSRFVR AVYLKEHLEP  
AADETKGVTA AFQLLANMTV PKGAVITEKD EIHYTQYTSV MCNDTGNYYF HLYDNRQIQK  
VNLFHEDLDR LEPKVFSAKA EESIHEL N

Fig. 5

# ES 2 605 958 T3

SEQ ID NO 6

MCTSILTLETA	DRNHVLARTM	DFAFQLGTEV	ILYPRRYNWM	SEADGKAHQ	QYAFIGMGRK
LGNILFADGI	NENGLSCAAL	YFPGYAEYEK	TIQEATVHIA	PHEFVTWALS	SCKSLEDVKE
KMRSLTIVEK	KLDLLDTVLP	LHWILSDRTG	RSLTIEPRAE	GLKVYDNQPG	VMTNSPDFIW
HVTNLQQYTG	IRPKQLESKE	MGGLALSAPG	QGLGTIGLPG	DYTPPSRFVR	AVYLKEHLEP
AADETKGVTA	AFQLLANMTV	PKGAVITEKD	EIHYTQYTSV	MCNDTGNYYF	HLYDNRQIQK
VNLFHEDLDR	LEPKVFSAKA	EESIHELN			

Fig. 6

SEQ ID NO 7

MCTSILTLETA	DRNHLLARTM	DFAFQLGTEV	ILYPRRYSWM	SEADGKAHQ	QYAFIGMGRK
LGNILFADGI	NENGLSCAAL	YFPGYAEYEK	TIQEATVHIA	PHEFVTWALS	SCKSLEDVKE
KMRSLTIVEK	KLDLLDTVLP	LHWILSDRTG	RSLTIEPRAE	GLKVYDNQPG	VMTNSPDFIW
HVTNLQQYTG	IRPKQLESKE	MGGLALSAPG	QGLGTIGLPG	DYTPPSRFVR	AVYLKEHLEP
AADETKGVTA	AFQLLANMTV	PKGAVITEKD	EIHYTQYTSV	MCNDTGNYYF	HLYDNRQIQK
VNLFHEDLDR	LEPKVFSAKA	EESIHELN			

Fig. 7

SEQ ID NO 8

MCTSILTLETA	DRNHLLARTM	DFAFQLGTEV	ILYPRRYNWN	SEADGKAHQ	QYAFIGMGRK
LGNILFADGI	NENGLSCAAL	YFPGYAEYEK	TIQEATVHIA	PHEFVTWALS	SCKSLEDVKE
KMRSLTIVEK	KLDLLDTVLP	LHWILSDRTG	RSLTIEPRAE	GLKVYDNQPG	VMTNSPDFIW
HVTNLQQYTG	IRPKQLESKE	MGGLALSAPG	QGLGTIGLPG	DYTPPSRFVR	AVYLKEHLEP
AADETKGVTA	AFQLLANMTV	PKGAVITEKD	EIHYTQYTSV	MCNDTGNYYF	HLYDNRQIQK
VNLFHEDLDR	LEPKVFSAKA	EESIHELN			

Fig. 8

SEQ ID NO 9

MCTSILTLETA	DRNHLLARTM	DFAFQLGTEV	ILYPRRYNWM	SEADGRAHQ	QYAFIGMGRK
LGNILFADGI	NENGLSCAAL	YFPGYAEYEK	TIQEATVHIA	PHEFVTWALS	SCKSLEDVKE
KMRSLTIVEK	KLDLLDTVLP	LHWILSDRTG	RSLTIEPRAE	GLKVYDNQPG	VMTNSPDFIW
HVTNLQQYTG	IRPKQLESKE	MGGLALSAPG	QGLGTIGLPG	DYTPPSRFVR	AVYLKEHLEP
AADETKGVTA	AFQLLANMTV	PKGAVITEKD	EIHYTQYTSV	MCNDTGNYYF	HLYDNRQIQK
VNLFHEDLDR	LEPKVFSAKA	EESIHELN			

Fig. 9

SEQ ID NO 10

MCTSILTLETA	DRNHLLARTM	DFAFQLGTEV	ILYPRRYNWM	SEADGKAHQ	QYAFIGMGRK
LGNILFADAI	NENGLSCAAL	YFPGYAEYEK	TIQEATVHIA	PHEFVTWALS	SCKSLEDVKE
KMRSLTIVEK	KLDLLDTVLP	LHWILSDRTG	RSLTIEPRAE	GLKVYDNQPG	VMTNSPDFIW
HVTNLQQYTG	IRPKQLESKE	MGGLALSAPG	QGLGTIGLPG	DYTPPSRFVR	AVYLKEHLEP
AADETKGVTA	AFQLLANMTV	PKGAVITEKD	EIHYTQYTSV	MCNDTGNYYF	HLYDNRQIQK
VNLFHEDLDR	LEPKVFSAKA	EESIHELN			

Fig. 10

# ES 2 605 958 T3

SEQ ID NO 11

```
MCTSLLTLETA DRNHLLARTM DFAFQLGTEV ILYPRRYNWM SEADGKAHQ T QYAFIGMGRK
LGNILFADGF NENGLSCAAL YFPGYAEYEK TIQEATVHIA PHEFVTWALS SCKSLEDVKE
KMRSLTIVEK KLDLLDTVLP LHWILSDRTG RSLTIEPRAE GLKVYDNQPG VMTNSPDFIW
HVTNLQQYTG IRPKQLESKE MGGLALS AFG QGLGTIGLPG DYT PPSRFVR AVYLKEHLEP
AADETKGVTA AFQLLANMTV PKGAVITEKD EIHYTQYTSV MCNDTGNYYF HLYDNRQIQK
VNLFHEDLDR LEPKVFS AKA EESIHEL N
```

Fig. 11

SEQ ID NO 12

```
MCTSLLTLETA DRNHLLARTM DFAFQLGTEV ILYPRRYNWM SEADGKAHQ T QYAFIGMGRK
LGNILFADGI NENGLSCAAL YFPGYAEYEK TIQEATVHIA PHEFVTWALS SCKSLEDVKE
KMRSLTIVEK KLDLLDTVLP LHWILSDRTG RSLTIEPRAE GLKVYDNQPG VMTNSPDFIW
HVTNLQQYTG IRPKQLESKE MGGLALS AFG QGLGTIGLPG DYT PPSRFVR AVYLKEHLEP
AADETKGVTA AFQLLANMTV PKGAVITEKD EIHYTQYTSV MCNDTGNYYF HLYDNRQIQK
VNLFHEDLDR LEPKVFS AKA EESIHEL N
```

Fig. 12

SEQ ID NO 13

```
MCTSLLTLETA DRNHLLARTM DFAFQLGTEV ILYPRRYNWM SEADGKAHQ T QYAFIGMGRK
LGNILFADGI NENGLSCAAL YFPGYAEYEK MIQEATVHIA PHEFVTWALS SCKSLEDVKE
KMRSLTIVEK KLDLLDTVLP LHWILSDRTG RSLTIEPRAE GLKVYDNQPG VMTNSPDFIW
HVTNLQQYTG IRPKQLESKE MGGLALS AFG QGLGTIGLPG DYT PPSRFVR AVYLKEHLEP
AADETKGVTA AFQLLANMTV PKGAVITEKD EIHYTQYTSV MCNDTGNYYF HLYDNRQIQK
VNLFHEDLDR LEPKVFS AKA EESIHEL N
```

Fig. 13

SEQ ID NO 14

```
MCTSLLTLETA DRNHLLARTM DFAFQLGTEV ILYPRRYNWM SEADGKAHQ T QYAFIGMGRK
LGNILFADGI NENGLSCAAL YFPGYAEYEK TIQEATVHIA PHEFVTWALS SCKSLEDVKE
KMRSLTIVEK KLDLLDTVLP LHWILSDRTG RSLTIEPRAE GLKVYDNQPG VMTNSPDFIW
HVTNLQQYTG IRPKQLESKE MGGLALS AFG QGLGTIGLPG DYT PPSRFVR AVYLKEHLEP
AADETKGVTA AFQLLANMTV PKGAVITEKD EIHYTQYTSV MCNDTGNYYF HLYDNRQIQK
VNLFHEDLDR LEPKVFS AKA EESIHEL N
```

Fig. 14

SEQ ID NO 15

```
MCTSLLTLETA DRNHLLARTM DFAFQLGTEV ILYPRRYNWM SEADGKAHQ T QYAFIGMGRK
LGNILFADGI NENGLSCAAL YFPGYAEYEK TIQEDTVHIA PHEFVTWALS SCKSLEDVKE
KMRSLTIVEK KLDLLDTVLP LHWILSDRTG RSLTIEPRAE GLKVYDNQPG VMTNSPDFIW
HVTNLQQYTG IRPKQLESKE MGGLALS AFG QGLGTIGLPG DYT PPSRFVR AVYLKEHLEP
AADETKGVTA AFQLLANMTV PKGAVITEKD EIHYTQYTSV MCNDTGNYYF HLYDNRQIQK
VNLFHEDLDR LEPKVFS AKA EESIHEL N
```

Fig. 15



# ES 2 605 958 T3

SEQ ID NO 16

```
MCTSLLTLETA DRNHLLARTM DFAFQLGTEV ILYPRRYNWM SEADGKAHQ T QYAFIGMGRK
LGNILFADGI NENGLSCAAL YFPGYAEYEK TIQEATVHIV PHEFVTWALS SCKSLLEDVKE
KMRSLTIVEK KLDLLD TVLP LHWILSDRTG RSLTIEPRAE GLKVYDNQPG VMTNSPDFIW
HVTNLQQYTG IRPKQLESKE MGGLALS AFG QGLGTIGLPG DYT PPSRFVR AVYLKEHLEP
AADETKGVTA AFQLLANMTV PKGAVITEKD EIHYTQYTSV MCNDTGNYYF HLYDNRQIQK
VNLFHEDLDR LEPKVFS AKA EESIHEL N
```

Fig. 16

SEQ ID NO 17

```
MCTSLLTLETA DRNHLLARTM DFAFQLGTEV ILYPRRYNWM SEADGKAHQ T QYAFIGMGRK
LGNILFADGI NENGLSCAAL YFPGYAEYEK TIQEATVHIA PHEFVTWALS SCKSLLEDVKE
KMRSLTIVEK KLDLLD TVLP LHWILSDRTG RSLTIEPRAE GLKVYDNQPG VMTNSPDFIW
HVTNLQQYTG IRPKQLESKE MGGLALS AFG QGLGTIGLPG DYT PPSRFVR AVYLKEHLEP
AADETKGVTA AFQLLANMTV PKGAVITEKD EIHYTQYTSV MCNDTGNYYF HLYDNRQIQK
VNLFHEDLDR LEPKVFS AKA EESIHEL N
```

Fig. 17

SEQ ID NO 18

```
MCTSLLTLETA DRNHLLARTM DFAFQLGTEV ILYPRRYNWM SEADGKAHQ T QYAFIGMGRK
LGNILFADGI NENGLSCAAL YFPGYAEYEK TIQEATVHIA PHEFVTWALS VCKSLLEDVKE
KMRSLTIVEK KLDLLD TVLP LHWILSDRTG RSLTIEPRAE GLKVYDNQPG VMTNSPDFIW
HVTNLQQYTG IRPKQLESKE MGGLALS AFG QGLGTIGLPG DYT PPSRFVR AVYLKEHLEP
AADETKGVTA AFQLLANMTV PKGAVITEKD EIHYTQYTSV MCNDTGNYYF HLYDNRQIQK
VNLFHEDLDR LEPKVFS AKA EESIHEL N
```

Fig. 18

SEQ ID NO 19

```
MCTSLLTLETA DRNHLLARTM DFAFQLGTEV ILYPRRYNWM SEADGKAHQ T QYAFIGMGRK
LGNILFADGI NENGLSCAAL YFPGYAEYEK TIQEATVHIA PHEFVTWALS SCQSLEDVKE
KMRSLTIVEK KLDLLD TVLP LHWILSDRTG RSLTIEPRAE GLKVYDNQPG VMTNSPDFIW
HVTNLQQYTG IRPKQLESKE MGGLALS AFG QGLGTIGLPG DYT PPSRFVR AVYLKEHLEP
AADETKGVTA AFQLLANMTV PKGAVITEKD EIHYTQYTSV MCNDTGNYYF HLYDNRQIQK
VNLFHEDLDR LEPKVFS AKA EESIHEL N
```

Fig. 19

SEQ ID NO 20

```
MCTSLLTLETA DRNHLLARTM DFAFQLGTEV ILYPRRYNWM SEADGKAHQ T QYAFIGMGRK
LGNILFADGI NENGLSCAAL YFPGYAEYEK TIQEATVHIA PHEFVTWALS SCKSLLEDVKE
KIRSLTIVEK KLDLLD TVLP LHWILSDRTG RSLTIEPRAE GLKVYDNQPG VMTNSPDFIW
HVTNLQQYTG IRPKQLESKE MGGLALS AFG QGLGTIGLPG DYT PPSRFVR AVYLKEHLEP
AADETKGVTA AFQLLANMTV PKGAVITEKD EIHYTQYTSV MCNDTGNYYF HLYDNRQIQK
VNLFHEDLDR LEPKVFS AKA EESIHEL N
```

Fig. 20

# ES 2 605 958 T3

SEQ ID NO 21

```
MCTSLLTLETA DRNHLLARTM DFAFQLGTEV ILYPRRYNWM SEADGKAHQ T QYAFIGMGRK
LGNILFADGI NENGLSCAAL YFPGYAEYEK TIQEATVHIA PHEFVTWALS SCKSLEDVKE
KMRSLTIVEK KLDLLDTVLP LHWILSDRTG RNLTI EPRAE GLKVYDNQPG VMTNSPDFIW
HVTNLQQYTG IRPKQLESKE MGGLALS AFG QGLGTIGLPG DYT PPSRFVR AVYLKEHLEP
AADETKGVTA AFQLLANMTV PKGAVITEKD EIHYTQYTSV MCNDTGNYYF HLYDNRQIQK
VNLFHEDLDR LEPKVFS AKA EESIHEL N
```

Fig. 21

SEQ ID NO 22

```
MCTSLLTLETA DRNHLLARTM DFAFQLGTEV ILYPRRYNWM SEADGKAHQ T QYAFIGMGRK
LGNILFADGI NENGLSCAAL YFPGYAEYEK TIQEATVHIA PHEFVTWALS SCKSLEDVKE
KMRSLTIVEK KLDLLDTVLP LHWILSDRTG RSLTI EPRAE GLKVYDNQPG VMTNSPDFIW
HVTNLQQYTG IRPKQLESKE MGGLALS AFG QGLGTIGLPG DYT PPSRFVR AVYLKEHLEP
AADETKGVTA AFQLLANMTV PKGAVITEKD EIHYTQYTSV MCNDTGNYYF HLYDNRQIQK
VNLFHEDLDR LEPKVFS AKA EESIHEL N
```

Fig. 22

SEQ ID NO 23

```
MCTSLLTLETA DRNHLLARTM DFAFQLGTEV ILYPRRYNWM SEADGKAHQ T QYAFIGMGRK
LGNILFADGI NENGLSCAAL YFPGYAEYEK TIQEATVHIA PHEFVTWALS SCKSLEDVKE
KMRSLTIVEK KLDLLDTVLP LHWILSDRTG RSLTI EPRAE GLKVYDNQPG VMTNSPDFIW
HVTNLQQYTG IRPKQLESKE MGGLALS AFG QGLGTVGLPG DYT PPSRFVR AVYLKEHLEP
AADETKGVTA AFQLLANMTV PKGAVITEKD EIHYTQYTSV MCNDTGNYYF HLYDNRQIQK
VNLFHEDLDR LEPKVFS AKA EESIHEL N
```

Fig. 23

SEQ ID NO 24

```
MCTSLLTLETA DRNHLLARTM DFAFQLGTEV ILYPRRYNWM SEADGKAHQ T QYAFIGMGRK
LGNILFADGI NENGLSCAAL YFPGYAEYEK TIQEATVHIA PHEFVTWALS SCKSLEDVKE
KMRSLTIVEK KLDLLDTVLP LHWILSDRTG RSLTI EPRAE GLKVYDNQPG VMTNSPDFIW
HVTNLQQYTG IRPKQLESKE MGGLALS AFG QGLGTIGLSG DYT PPSRFVR AVYLKEHLEP
AADETKGVTA AFQLLANMTV PKGAVITEKD EIHYTQYTSV MCNDTGNYYF HLYDNRQIQK
VNLFHEDLDR LEPKVFS AKA EESIHEL N
```

Fig. 24

SEQ ID NO 25

```
MCTSLLTLETA DRNHLLARTM DFAFQLGTEV ILYPRRYNWM SEADGKAHQ T QYAFIGMGRK
LGNILFADGI NENGLSCAAL YFPGYAEYEK TIQEATVHIA PHEFVTWALS SCKSLEDVKE
KMRSLTIVEK KLDLLDTVLP LHWILSDRTG RSLTI EPRAE GLKVYDNQPG VMTNSPDFIW
HVTNLQQYTG IRPKQLESKE MGGLALS AFG QGLGTIGLPG DYT PPSRFVR AVYLKEHLEP
AADETKGVTA AFQILANMTV PKGAVITEKD EIHYTQYTSV MCNDTGNYYF HLYDNRQIQK
VNLFHEDLDR LEPKVFS AKA EESIHEL N
```

Fig. 25

## ES 2 605 958 T3

SEQ ID NO 26

```
MCTSLLTLETA DRNHLLARTM DFAFQLGTEV ILYPRRYNWM SEADGKAHQ T QYAFIGMGRK
LGNILFADGI NENGLSCAAL YFPGYAEYEK TIQEATVHIA PHEFVTWALS SCKSLLEDVKE
KMRSLTIVEK KLDLLDTVLP LHWILSDRTG RSLTIEPRAE GLKVYDNQPG VMTNSPDFIW
HVTNLQQYTG IRPKQLESKE MGGLALS AFG QGLGTIGLPG DYT PPSRFVR AVYLKEHLEP
AADETKGVTA AFQLLANMTI PKGAVITEKD EIHYTQYTSV MCNDTGNYYF HLYDNRQIQK
VNLFHEDLDR LEPKVFS AKA EESIHEL N
```

Fig. 26

SEQ ID NO 27

```
MCTSLLTLETA DRNHLLARTM DFAFQLGTEV ILYPRRYNWM SEADGKAHQ T QYAFIGMGRK
LGNILFADGI NENGLSCAAL YFPGYAEYEK TIQEATVHIA PHEFVTWALS SCKSLLEDVKE
KMRSLTIVEK KLDLLDTVLP LHWILSDRTG RSLTIEPRAE GLKVYDNQPG VMTNSPDFIW
HVTNLQQYTG IRPKQLESKE MGGLALS AFG QGLGTIGLPG DYT PPSRFVR AVYLKEHLEP
AADETKGVTA AFQLLANMTV PKGAVITEED EIHYTQYTSV MCNDTGNYYF HLYDNRQIQK
VNLFHEDLDR LEPKVFS AKA EESIHEL N
```

Fig. 27

SEQ ID NO 28

```
MCTSLLTLETA DRNHLLARTM DFAFQLGTEV ILYPRRYNWM SEADGKAHQ T QYAFIGMGRK
LGNILFADGI NENGLSCAAL YFPGYAEYEK TIQEATVHIA PHEFVTWALS SCKSLLEDVKE
KMRSLTIVEK KLDLLDTVLP LHWILSDRTG RSLTIEPRAE GLKVYDNQPG VMTNSPDFIW
HVTNLQQYTG IRPKQLESKE MGGLALS AFG QGLGTIGLPG DYT PPSRFVR AVYLKEHLEP
AADETKGVTA AFQLLANMTV PKGAVITEKD EIHYTQYTSV MCNETGNYYF HLYDNRQIQK
VNLFHEDLDR LEPKVFS AKA EESIHEL N
```

Fig. 28

SEQ ID NO 29

```
MCTSLLTLETA DRNHLLARTM DFAFQLGTEV ILYPRRYNWM SEADGKAHQ T QYAFIGMGRK
LGNILFADGI NENGLSCAAL YFPGYAEYEK TIQEATVHIA PHEFVTWALS SCKSLLEDVKE
KMRSLTIVEK KLDLLDTVLP LHWILSDRTG RSLTIEPRAE GLKVYDNQPG VMTNSPDFIW
HVTNLQQYTG IRPKQLESKE MGGLALS AFG QGLGTIGLPG DYT PPSRFVR AVYLKEHLEP
AADETKGVTA AFQLLANMTV PKGAVITEKD EIHYTQYTSV MCNDTGNYYF HLYDNRQIQK
VNLFHEDLDR LEPKVFS AKA EESIHEL N
```

Fig. 29

SEQ ID NO 30

```
MCTSLLTLETA DRNHLLARTM DFAFQLGTEV ILYPRRYNWM SEADGKAHQ T QYAFIGMGRK
LGNILFADGI NENGLSCAAL YFPGYAEYEK TIQEATVHIA PHEFVTWALS SCKSLLEDVKE
KMRSLTIVEK KLDLLDTVLP LHWILSDRTG RSLTIEPRAE GLKVYDNQPG VMTNSPDFIW
HVTNLQQYTG IRPKQLESKE MGGLALS AFG QGLGTIGLPG DYT PPSRFVR AVYLKEHLEP
AADETKGVTA AFQLLANMTV PKGAVITEKD EIHYTQYTSV MCNDTGNYYF HLYDNRQIQK
VNLFHEDLDC LEPKVFS AKA EESIHEL N
```

Fig. 30

ES 2 605 958 T3

SEQ ID NO 31

MCTSLTLETA DRNHVLARTM DFAFQLGTEV ILYPRRYSWM SEADGRAHQT QYAFIGMGRK  
LGNILFADGI NESGLSCAAL YFPGYAEYEK TIREATVHIA PHEFVTWALS SCQSLEDVKE  
KIRSLTIVEK KLDLLDTVLP LHWILSDRTG RNLTIEPRAD GLKVYDNQPG VMTNSPDFIW  
HVTNLQOYTG IRPKQLESKE MGGLALSFG QGLGTIGLPG DYTPPSRFVR AVYLKEHLEP  
AADETKGVTA AFQILANMTI PKGAVITEED EIHYTQYTSV MCNETGNYYF HLYDNRQIQK  
VNLFHEDLDR LEPKVFSAKA EESIHELN

Fig. 31

SEQ ID NO 32

ATGTGCACATCTCTTACACTTGAAACAGCTGATCGTAACCATCTTCTTGC 50  
TCGTACAATGGATTTTCGCTTTCCAACCTGGCACAGAAGTTATCCTTTACC 100  
CTCGTCGTTACAACCTGGATGTCTGAAGCTGATGGCAAAGCTCATCAAACA 150  
CAATACGCTTTTCATCGGCATGGGCCGTAACCTGGCAACATCCTTTTCGC 200  
TGATGGCATCAACGAAAACGGCCCTTTCTTGCCTGCTCTTTACTTCCCTG 250  
GCTACGCTGAATACGAAAAACAATCCAAGAAGCTACAGTTCATATCGCT 300  
CCTCATGAATTCGTTACATGGGCTCTTTCTTCTTGCAAATCTCTTGAAGA 350  
TGTTAAAGAAAAATGCGTTCTCTTACAATCGTTGAAAAAAAACCTTGATC 400  
TTCTTGATACAGTTCTTCTTCTTATTGGATCCTTTCTGATCGTACAGGC 450  
CGTTCTCTTACAATCGAACCTCGTGCTGAAGGCCTTAAAGTTTACGATAA 500  
CCAACCTGGCGTTATGACAACTCTCCTGATTTTCATCTGGCATGTTACAA 550  
ACCTTCAACAATACACAGGCATCCGTCCTAAACAACCTTGAATCTAAAGAA 600  
ATGGGCGGCCTTGCTCTTTCTGCTTTTCGGCCAAGGCCTTGGCACAATCGG 650  
CCTTCTGCGGATTACACACCTCCTTCTCGTTTCGTTTCGTTGCTGTTTACC 700  
TTAAAGAACATCTTGAACCTGCTGCTGATGAAACAAAAGGCGTTACAGCT 750  
GCTTTCCAACCTTCTTGCTAACATGACAGTTCCTAAAGGCGCTGTTATCAC 800  
AGAAAAAGATGAAATCCATTACACACAATACACATCTGTTATGTGCAACG 850  
ATACAGGCAACTACTACTTCCATCTTTACGATAACCGTCAAATCCAAAAA 900  
GTTAACCTTTTCCATGAAGATCTTGATCGTCTTGAACCTAAAGTTTCTC 950  
TGCTAAAGCTGAAGAATCTATCCATGAACTTAAC

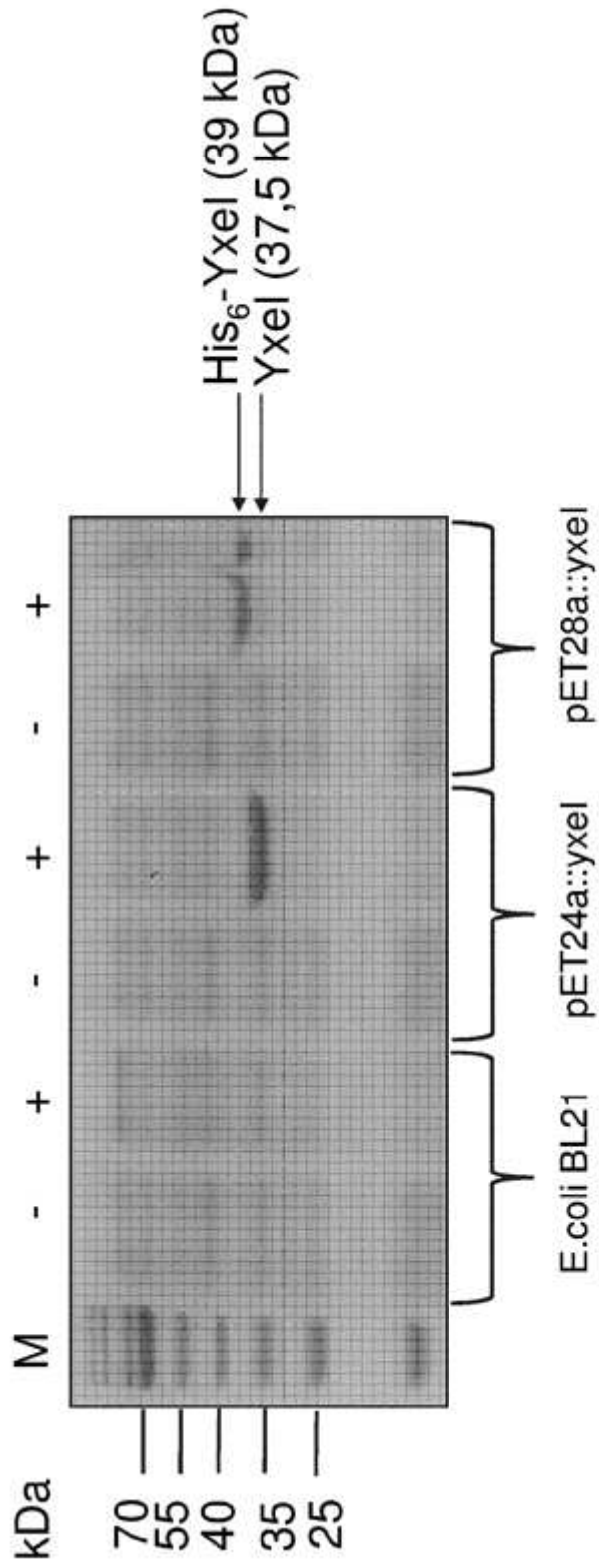
Fig. 32

# ES 2 605 958 T3

SEQ ID NO 33

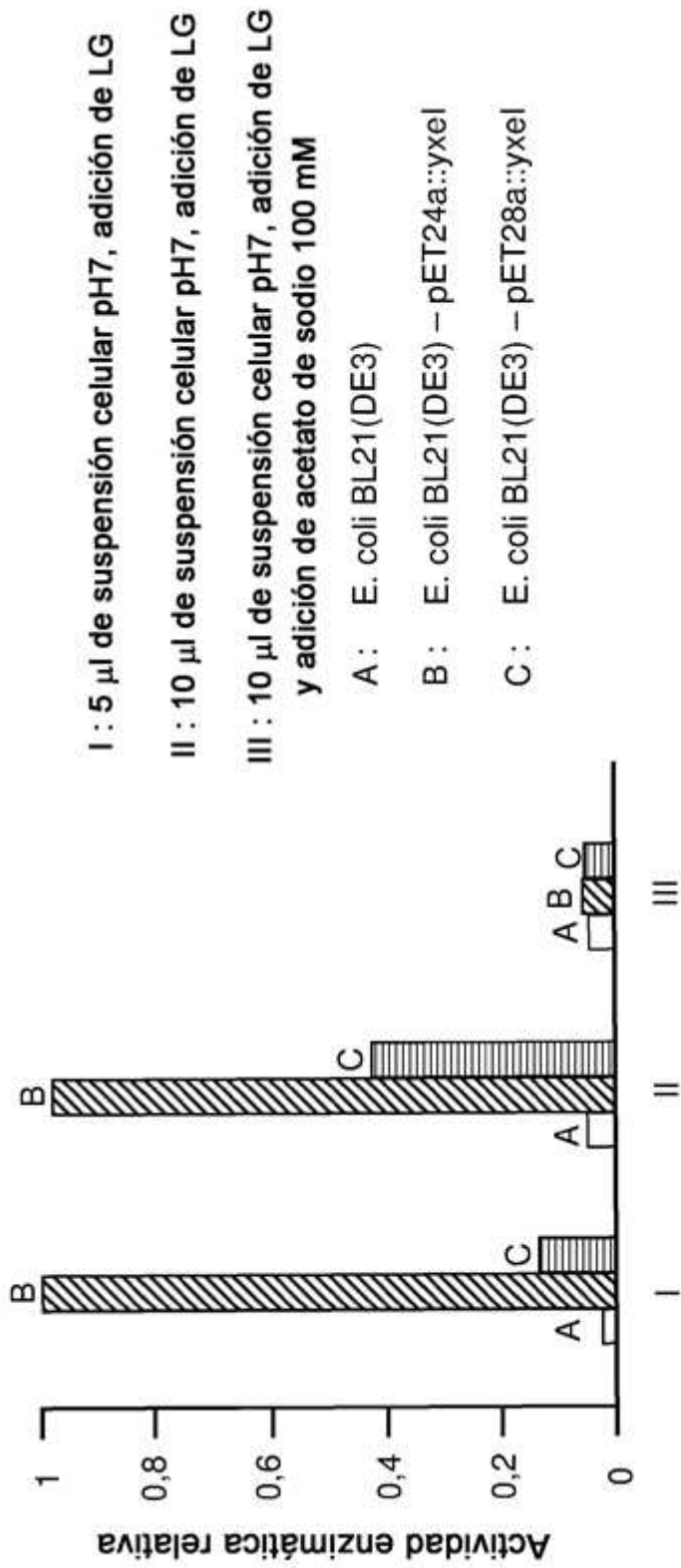
ATGTGCACCTCTCTGACCCTGGAAACCGCTGACCGTAACCACCTGCTGGC	50
TCGTACCATGGACTTCGCCTTCCAGCTGGGTACCGAAGTTATCCTGTACC	100
CGCGTCGTTACAACCTGGATGTCTGAAGCTGACGGTAAAGCTCACCAGACC	150
CAGTACGCTTTCATCGGTATGGGTCGTAAACTGGGTAACATCCTGTTCCG	200
TGACGGTATCAACGAAAACGGTCTGTCTTGCGCTGCTCTGTACTTCCC	250
GTTACGCTGAATACGAAAAACCATCCAGGAAGCTACCGTTCACATCGCT	300
CCGCACGAATTCGTTACCTGGGCTCTGTCTTCTTGCAAATCTCTGGAAGA	350
CGTTAAAGAAAAATGCGTTCCTCTGACCATCGTTGAAAAAAACTGGACC	400
TGCTGGACACCGTTCCTGCCGCTGCACTGGATCCTGTCTGACCGTACCGGT	450
CGTTCTCTGACCATCGAACCGCGTGTCTGAAGGTCTGAAAGTTTACGACAA	500
CCAGCCGGGTGTTATGACCAACTCTCCGGACTTCATCTGGCACGTTACCA	550
ACCTGCAGCAGTACACCGGTATCCGTCCGAAACAGCTGGAATCTAAAGAA	600
ATGGGTGGTCTGGCTCTGTCTGCTTTCGGTCAGGGTCTGGGTACCATCGG	650
TCTGCCGGGTGACTACACCCGCCGTCTCGTTTCGTTTCGTGCTGTTTACC	700
TGAAAGAACACCTGGAACCGGCTGCTGACGAAACCAAAGGTGTTACCGCT	750
GCTTTCAGCTGCTGGCTAACATGACCCTCCGAAAGGTGCTGTTATCAC	800
CGAAAAAGACGAAATCCACTACACCCAGTACACCTCTGTTATGTGCAACG	850
ACACCGGTAACACTACTACTTCCACCTGTACGACAACCGTCAGATCCAGAAA	900
GTTAACCTGTTCCACGAAGACCTGGACCGTCTGGAACCGAAAGTTTTCTC	950
TGCTAAAGCTGAAGAATCTATCCACGAACCTGAAC	

Fig. 33



-: extracto celular completo antes de la inducción con IPTG 0,1 mM  
+: extracto celular completo antes de la inducción con IPTG 0,1 mM

Fig. 34



Suspensión celular: Cultivo de células *E. coli*, recogidas, lavadas dos veces con tampón PBS y ajustadas a DO600 = 30

Fig. 35