

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 608 033**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/06** (2006.01)

**C12P 21/06** (2006.01)

**C12P 21/00** (2006.01)

**A23J 3/08** (2006.01)

**A23J 3/14** (2006.01)

**A23J 3/22** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.03.2008 PCT/EP2008/053212**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2008 WO08113799**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.03.2008 E 08717945 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2126060**

54 Título: **Nuevas lisil oxidasas**

30 Prioridad:

**22.03.2007 EP 07104645**

**12.12.2007 EP 07123028**

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

**05.04.2017**

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)**

**Het Overloon 1**

**6411 TE Heerlen, NL**

72 Inventor/es:

**DIJK, VAN, ALBERTUS, ALARD;**

**DEKKER, PETRUS, JACOBUS, THEODORUS;**

**WESTERLAKEN, ILJA y**

**BAKHUIS, JANNA GARDINA**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 608 033 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

Nuevas lisil oxidasas.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a lisil oxidasas.

## 5 Antecedentes de la invención

Lisil oxidasas

Las amina oxidasas forman una familia heterogénea de enzimas que catalizan la oxidación de sustratos de amina primarios en aldehídos reactivos. Las enzimas se subdividen en dos grupos en función de la naturaleza de su cofactor. El dinucleótido de adenina flavina (FAD, por sus siglas en inglés) es el cofactor de enzimas tales como monoamina oxidasa A y B y de una forma intracelular de poliamina oxidasa (Csiszar, Progr. Nucl Ac Res y Mol Biol (2001), 70, 1-32). Un segundo grupo de amina oxidasas contiene una quinona, una cadena lateral de tirosina modificada, utilizada como cofactor (Wang et al, Science (1996) 273, 1078-1084). Las enzimas lisil oxidasa (LOX) pertenecen a esta subfamilia de amina oxidasas.

15 Las amina oxidasas catalizan la desaminación oxidativa de aminas primarias, secundarias y terciarias en los aldehídos correspondientes, con la posterior reducción de O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tal como se ilustra a continuación:



Las aminas que se encuentran en mamíferos entran en los dos grupos mencionados anteriormente, las monoamina oxidasas dependientes de flavina (MAO) y las amina oxidasas de cobre que contienen quinona (CuAO) (Duff et al, Biochem (2003) 42, 15148-15157). Las MAO se encuentran exclusivamente en la membrana mitocondrial externa de prácticamente todos los tipos de células y participan en la degradación de aminas primarias, secundarias y terciarias y en la oxidación de diversos neurotransmisores. Se cree que las MAO funcionan a través de una transferencia de electrones simple o a través de un mecanismo de catálisis covalente coordinado, con la participación del cofactor FAD en ambos (Duff et al, Biochem (2003) 42, 15148-15157 y referencias citadas en la misma). Las CuAO que contienen quinona parecen participar exclusivamente en la desaminación oxidativa de las aminas primarias. Estas enzimas pueden subdividirse en dos clases, en función del tipo de cofactor quinona presente en el sitio activo: topa quinona (TPQ) o lisil tirosilquinona (LTQ). Se sabe hace mucho tiempo que las enzimas de la última clase, conocidas como lisil oxidasas, están asociadas con la formación de tejido conjuntivo a través de la catálisis de la desaminación crucial de la cadena lateral de peptidil lisina que inicia la reticulación de los residuos de lisina en el colágeno y la elastina (Csiszar, Progr. Nucl Ac Res y Mol Biol (2001), 70, 1-32). Aunque todavía se debe estudiar la biogénesis del factor de LTQ, la biogénesis de TPQ se ha estudiado exhaustivamente, por ejemplo, utilizando múltiples estructuras de cristal atrapadas (Duff et al, Biochem (2003) 42, 15148-15157). La conversión de un residuo de tirosina en TPQ requiere solo enzima apo no procesada, cobre y oxígeno molecular. La tirosina que se modifica está presente en la secuencia consenso del sitio activo conservado Asn-Tyr-Asp/Glu (Mu et al, J Biol Chem (1992) 267, 7979-7982).

La catálisis mediante CuAO procede a través de un mecanismo ping-pong (Wilmot et al, Science (1999) 286, 1724-1728). La etapa clave es la conversión de la quinonaimina inicial en quinoaldimina, facilitada por la captación de protones desde el alfa-carbono del sustrato mediante un aspartato absolutamente conservado que actúa como base general. La hidrólisis provoca la liberación del producto aldehído, proporcionando un Cu(II)-aminorresorcinol en equilibrio con Cu(I)-semiquinona, que posteriormente hace reacción con dióxígeno para producir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y una iminoquinona. A continuación se hidroliza la segunda, liberando NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y el cofactor vuelve a su estado de reposo.

Las CuAO que contienen TPQ están distribuidas extensamente en la naturaleza y se han purificado a partir de mamíferos, plantas y microorganismos. Participan en la oxidación de muchas mono y diaminas alifáticas de cadena corta y larga, incluidas diversas aminas aromáticas (Duff et al, Biochem (2003) 42, 15148-15157). En microorganismos tienen un papel nutritivo en la utilización de aminas primarias como única fuente de nitrógeno o carbono. El papel de las amina oxidasas en organismos superior no es tan claro. Se han propuesto diversos papeles para estas enzimas en plantas y mamíferos tales como curación de heridas, reducción de la concentración de aminas tóxicas, crecimiento celular, señalización y adhesión.

La inducción de metaloproteínas por medio de iones metálicos se ha observado en una amplia gama de tejidos animales y organismos microbianos (Rayton & Harris, J Biol Chem (1979) 254, 621-626). Haywood and Large (Biochem J (1981) 199, 187-201) utilizó este principio posteriormente para ayudar a inducir la expresión de amina oxidasas microbianas durante el crecimiento en medios que contenían aminas como única fuente de nitrógeno. Lograron inducir la expresión de dos amina oxidasas en *Candida boidinii*. La presencia de dos amina oxidasas parece ser común en levaduras (Kuchar & Dooley, J Inorg Biochem (2001) 83, 193-204). Purificaron las enzimas correspondientes y mostraron que diferían en la especificidad de sustrato. Las enzimas se denominaron metilamina oxidasa y bencilamina oxidasa. Más adelante, se mostró en un abordaje similar que la levadura *Pichia pastoris*

también contiene dos amina oxidasas (Green et al, Biochem J (1983) 211, 481-493). Tur & Lerch (FEBS Letters (1988) 238, 74-76) caracterizaron adicionalmente la bencilamina oxidasa. Demostraron que la oxidasa contiene un grupo quinona, un átomo de cobre y que la enzima tiene una especificidad de sustrato amplia. Mediante el uso de lisina, péptidos modelo, elastina y colágeno como sustratos, mostraron que la oxidasa tiene considerable actividad de lisil-oxidasa. Basándose en estudios de inhibición con  $\beta$ -aminopropionitril sugirieron que la enzima es una lisil-oxidasa de cobre (E.C. 1.4.3.13). Desde entonces, la enzima se ha denominado lisil oxidasa. Dove et al (FEBS Letters (1996) 398, 231-234) mostraron que esta lisil oxidasa de cobre contiene TPQ como cofactor, lo cual la distingue de las lisil oxidasas que son todas de mamífero y contienen LTQ como cofactor. Kuchar & Dooley (J Inorg Biochem (2001) 83, 193-204) clonaron, secuenciaron y caracterizaron adicionalmente la enzima. Lograron sobreexpresar la enzima intracelular hasta 10 mg por litro, convirtiéndola en la primera lisil oxidasa que se sobreexpresó con éxito. Confirmaron la presencia de 1 ion de cobre por molécula de enzima y la presencia del cofactor TPQ. Extendieron además el trabajo sobre la especificidad de sustrato de la enzima, mostrando que es de algún modo similar a las oxidasas de mamífero y es capaz de oxidar residuos de lisina en péptidos. Sin embargo, la lisil oxidasa de *Pichia pastoris* tiene una especificidad de sustrato mucho más amplia en comparación con las enzimas de mamífero (Kuchar & Dooley, J Inorg Biochem (2001) 83, 193-204). La enzima muestra una homología secuencial bastante baja con otras amina oxidasas. La homología más alta fue con la diamina oxidasa de riñón humano (50 % de similitud, 30 % de identidad). Una comparación secuencial con otras amina oxidasas mostró que solo se conservaban de forma absoluta 29 residuos, incluidos aquellos en la secuencia consenso de TPQ (Thr-Xxx-Xxx-Asn-Tyr-Glu/Asp-Tyr, donde Xxx es cualquiera de los veinte aminoácidos naturales) y las tres histidinas que forman complejo con el átomo de cobre.

Se determinaron las estructuras tridimensionales de cinco amina oxidasas, originadas de *Escherichia coli* (Parsons et al, Structure (1995) 3, 1171-1184), *Pisum sativum* (Kumar et al, Structure (1996) 4, 943-955), *Hansenula polymorpha* (Li et al, Structure (1998) 6, 293-307), *Arthrobacter globiformis* (Wilce et al, Biochemistry (1997) 36, 16116-16133) y *Pichia pastoris* (Duff et al, Biochem (2003) 42, 15148-15157; Duff et al, Acta crystallogr D Biol crystallogr (2006) 62, 1073-1084). La enzima de *Pichia* es la única que es una lisil oxidasa. Sus estructuras son similares, con cuatro dominios estructurales denominados D1, D2, D3 y D4 respectivamente. El dominio D1 solo se ha observado en la enzima de *E coli*, pero se propuso que existe en la enzima de *Pichia* también. El sitio activo está ubicado en el dominio central grande D4, los dominios más pequeños D3 y D2 están en dirección al extremo N con respecto al dominio D4. Las enzimas se cristalizan como dímeros. Es inusual la presencia de una cavidad grande llena de disolvente, denominada lago, en el interior del dímero entre los dos dominios D4. El sitio de cobre en cada subunidad se apoya sobre el lago con el cofactor TPQ ubicado en el lado distal del átomo de cobre. Un canal largo y estrecho conecta el TPQ con el disolvente externo (Duff et al, Biochem (2003) 42, 15148-15157). Este canal hasta el sitio activo es particularmente ancho en la enzima *Pichia* donde contiene en su entrada una secuencia de residuos ácidos Asp-Asp-Glu-Thr-Glu-Glu. Se piensa que estos residuos facilitan el ingreso del grupo amino lisina cargado a través de interacciones electrostáticas. Más adelante en el canal se vuelve hidrófobo, facilitando la desprotonación de los grupos lisina en la forma de amina neutra que posteriormente puede oxidarse en el sitio activo. El sitio activo comprende un átomo de cobre coordinado mediante tres histidinas (residuos número 528, 530 y 694) y por el O4 fo TPQ (residuo número 478). La posición de Asp398 en el sitio activo es consistente con el papel propuesto para este residuo como la base catalítica totalmente conservada.

Durante varios años, la lisil oxidasa de *Pichia pastoris* fue la única lisil oxidasa microbiana conocida. Sin embargo, EP1 466 979 describe el hallazgo de una amina oxidasa derivada de *Aspergillus oryzae* que se denomina lisil oxidasa. Los solicitantes utilizaron el genoma de *Aspergillus oryzae* para someter a barrido para detectar lisil oxidasas y describen el hallazgo de un gen que caracterizaron como altamente homólogo con el gen conocido de *Pichia pastoris*. No queda claro a partir de la descripción de la patente qué se considera altamente homólogo. Hicimos una alineación secuencial de las secuencias de *Pichia pastoris* y *Aspergillus oryzae* y sorprendentemente hallamos solo 35 % de identidad, lo cual en general no se considera como homología alta. Los porcentajes de 60 %, preferiblemente 70 %, más preferiblemente 80 % y más altos se considerarían homología alta. Además, la lisil oxidasa de *Aspergillus oryzae* difiere inesperadamente en diversas posiciones importantes respecto de otras lisil oxidasas y amina oxidasas: por ejemplo, la posición 164 de la proteína comentada del gen de *Asperillus oryzae* descrita en EP 1 466 979 (SEQ\_ID NO: 2) es una alanina, mientras que en todas las otras amina y lisil oxidasas descritas esta posición es una prolina altamente conservada. Además, la posición 78 en esta proteína comentada es una metionina, mientras que la leucina está altamente conservada en las amina oxidasas en esta posición. Adicionalmente, la proteína descrita en EP 1 466 979 contiene una inserción adicional de 2 aminoácidos tras el residuo 109 en comparación con la lisil oxidasa de mamífero y *Pichia*. Además la posición 499 en la proteína descrita en EP 1 466 979 es una treonina, mientras que esta posición es siempre un residuo hidrófobo en otras amina oxidasas. Las posiciones conservadas en las proteínas con frecuencia se asocian con la función primaria de una enzima y no pueden cambiarse sin cambiar la actividad catalítica de la enzima. Es extraordinario que en esta lisil oxidasa específica varios de dichos residuos conservados estén modificados, y se espera que tengan un efecto sobre la actividad enzimática.

El gen se clonó en *Aspergillus nidulans* a través de la integración aleatoria del gen en el genoma. Los solicitantes indican que en lugar de *A. nidulans*, también se podrían utilizar otras cepas tales como *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*. De forma sorprendente, se describe en EP1 466 979 que se podía medir la actividad de la lisil

oxidasa en el fluido de cultivo de algunos transformantes cuando este gen se sobreexpresaba, a diferencia de lo que sucede con la enzima *Pichia pastoris* que es una enzima intracelular. Aparentemente, la lisil oxidasa de *Aspergillus oryzae* es una enzima secretada. La presencia de la enzima se estableció a través de mediciones de actividad. Para la caracterización de las lisil oxidasas (E.C. 1.4.3.13) y su distinción respecto de las lisina oxidasas (E.C. 1.4.3.14) el uso de sustratos correctos es de gran importancia. El ensayo descrito para lisil oxidasa en EP1 466 979 (ejemplo 11 en dicha patente) usa lisina como único sustrato. Este aminoácido tiene dos grupos amino libres, uno en el átomo C<sup>α</sup> y uno en la cadena lateral de lisina en el átomo C<sup>ε</sup>. Las lisil oxidasas solo oxidan el último y dejan el otro grupo sin modificar. Esto puede determinarse utilizando sustratos de lisina en los que el grupo amino α se bloquea, por ejemplo, mediante acetilación. Dichos sustratos son esenciales para la identificación adecuada de lisil oxidasas, y se utilizan muy comúnmente en la caracterización de dichas enzimas (véase, por ejemplo, Kuchar & Dooley, J Inorg Biochem (2001) 83, 193-204). Dado que dichos sustratos no se utilizan en EP1 466 979 no es posible concluir a partir de los datos, proporcionados en EP1 466 979, que la actividad enzimática hallada es de hecho actividad de lisil oxidasa. La enzima podría ser bien una lisina oxidasa (E.C. 1.4.3.14; L-lisina: oxígeno 2-oxidorreductasa) y no una lisil oxidasa (E.C. 1.4.3.13, proteína-L-lisina: oxígeno 6-oxidorreductasa). Además, la actividad medida fue bastante baja, siendo apenas unas pocas veces mayor que la actividad ya registrada de la cepa no transformada (EP1 466 979, ejemplo 11). A efectos de aclarar este asunto intentamos sobreexpresar la proteína de la SEQ\_ID NO: 2 (EP 1 466 979) en *Aspergillus niger* (ejemplo 1 de la presente solicitud). Según EP1 466 979, *Aspergillus niger* es un organismo de expresión preferido para la lisil oxidasa. No logramos aislar o de otra forma demostrar una lisil oxidasa activa en el fluido de cultivo de todos los transformantes evaluados. En virtud de los argumentos mencionados anteriormente, en combinación con el trabajo experimental descrito en los ejemplos 1 y 2 de la presente solicitud, es improbable que EP1 466 979 describiera la identificación de una lisil oxidasa funcional. EP1 466 979 tampoco describe intentos de purificar la enzima sino que en cambio las mediciones de actividad se llevaron a cabo con sobrenadantes de fermentación brutos que pueden contener una variedad de actividades enzimáticas no especificadas. Además, no todos los transformantes descritos en EP 1 466 979 exhibieron actividad mayor en comparación con la cepa no transformada. Por lo tanto, es dudoso que la secuencia proteica descrita en EP 1 466 979 sea de hecho correcta y codifique para una lisil oxidasa funcional. La actividad de oxidasa que se ha medido en algunos de los transformantes en EP 1 466 979, por lo tanto, podría no deberse a la sobreexpresión del gen descrito sino que podría ser provocada por la presencia de actividad de amina oxidasa ya registrada. Sorprende que en el medio de la cepa de referencia, se agregue una cantidad considerable de arginina (EP1 466 979, ejemplo 11). Se sabe que las amina oxidasas pueden inhibirse mediante compuestos que contienen guanidina, tales como arginina (Kuchar & Dooley, J Inorg Biochem (2001) 83, 193-204), y la arginina contiene dicho grupo guanidina. En caso que la cepa vacía produjera cantidades bajas de actividad de amina oxidasas, la misma podría inhibirse mediante la arginina que está presente en el medio. Si este es el caso, la cepa vacía se evaluaría en una configuración que no es un buen testigo dado que el fondo se bajaría artificialmente. En dicha situación, podría ser el motivo para la actividad baja de los transformantes informada, que mostraron una actividad apenas unas pocas veces mayor que la ya registrada. Esta actividad baja podría ser la actividad de fondo normal observada en ausencia de arginina.

A partir de todo lo mencionado anteriormente, está claro que se conocen las lisil oxidasas, pero que no se ha producido ninguna lisil oxidasa extracelular. La lisil oxidasa de *Pichia* es una enzima intracelular y solo se produce a niveles de 10 mg/ml (Kuchar & Dooley, J Inorg Biochem (2001) 193-204). Además, la enzima debe ser liberada por el célula, lo cual hace que el procesamiento de la enzima a escala industrial sea complicado y poco atractivo. Dado que además otras lisil oxidasas no se han sobreproducido a niveles de expresión interesantes económicamente, todavía existe la necesidad de una lisil oxidasa extracelular que pueda producirse en grandes cantidades (gramos por litro).

Desde un punto de vista económico, existe una necesidad clara de un medio mejorado para producir lisil oxidasas en grandes cantidades y en una forma relativamente pura, en comparación con la escasa productividad de la enzima de *Pichia pastoris* y la alegada enzima de *Aspergillus oryzae*. Un modo preferido para hacerlo es a través de la sobreproducción de dicha lisil oxidasa utilizando técnicas de ADN recombinante. Un modo específicamente preferido para hacerlo es a través de la sobreproducción de una lisil oxidasa derivada de un hongo y un modo más preferido de hacerlo es a través de la sobreproducción de una lisil oxidasa derivada de *Aspergillus*. Para posibilitar la última vía de producción es esencial tener información secuencial única de una lisil oxidasa derivada de *Aspergillus*. De forma más preferible, se debe disponer de toda la secuencia de nucleótidos del gen codificante.

Una modo mejorado de producir la lisil oxidasa secretada nueva identificada en grandes cantidades y en una forma relativamente pura es a través de la sobreproducción de la enzima codificada por *Aspergillus* utilizando técnicas de ADN recombinante. Un modo preferido para hacerlo es a través de la sobreproducción de dicha lisil oxidasa en un microorganismo hospedador de uso alimentario. Los microorganismos de uso alimentario conocidos incluyen *Aspergilli*, *Trichoderma*, *Streptomyces*, *Bacilli* y levaduras tales como *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*. Un modo incluso más preferido para hacerlo es a través de la sobreproducción de la lisil oxidasa derivada de *Aspergillus* secretada en un hongo de uso alimentario tal como *Aspergillus*. El más preferido es la sobreproducción de la lisil oxidasa secretada en un hongo de uso alimentario en el que el uso del codón del gen que codifica para la lisil oxidasa se ha optimizado para el hospedador de la expresión de uso alimentario utilizado. En general, para posibilitar las últimas vías de optimización, es deseable tener información secuencial única de una lisil oxidasa secretada. De forma más preferible, se debe disponer de toda la secuencia de nucleótidos del gen que codifica para

la lisil oxidasa. Una vez que el gen que codifica para una lisil oxidasa secretada se transforma en un hospedador preferido, se pueden utilizar cepas seleccionadas para fermentación y aislamiento de la proteína lisil oxidasa secretada del caldo de fermentación.

5 Una vez que la nueva enzima se ha vuelto disponible en grandes cantidades y en una forma relativamente pura, las proteínas alimentarias o hidrolizados con textura mejorada pueden producirse para uso alimentario y de forma económica.

10 Las enzimas que pueden catalizar la formación de retículos proteicos covalentes son raras. Un ejemplo es la clase de proteínas sulfhidril oxidadas, que pueden catalizar la formación de enlaces disulfuro entre proteínas. La aplicabilidad de estas enzimas, sin embargo, es limitada principalmente debido a la aparición limitada de estos grupos sulfhidrilo libres en proteínas. Especialmente las proteínas alimentarias frecuentemente se someten a condiciones de oxidación durante el procesamiento (por ejemplo, durante el secado), que a menudo conducen a la oxidación de los grupos tiol disponibles. En algunas aplicaciones, sin embargo, tales como en el pan, la formación de enlaces disulfuro y el reajuste de enlaces disulfuro es de gran relevancia para la formación de la textura adecuada.

15 Otra clase de enzimas de reticulación proteica conocida es la transglutaminasa, que puede catalizar la formación de un retículo covalente entre proteínas a través de un residuo de lisina y uno de glutamina. La transglutaminasa (E.C. 2.3.2.13) cataliza una reacción de transferencia de acilo en la que los grupos  $\gamma$ -carboxamida de residuos de glutamina unidos a péptido son los donantes de acilo. La transglutaminasa microbiana, derivada de *Streptovorticillium mobaraense* se encuentra disponible en el mercado con el nombre comercial Activa TG (Ajinomoto, Japón), pero también existe transglutaminasa derivada de sangre disponible en el mercado (nombre comercial: Harimex). La transglutaminasa se ha utilizado para catalizar la reticulación de proteínas de lactosuero, proteínas de soja, proteínas de trigo, miosina de carne vacuna, caseína y actomiosina bruta refinada a partir de carne de ave deshuesada mecánicamente, (Zhu et al, Appl Microbiol Biotechnol (1995) 44, 277-282). El uso de transglutaminasa también se ha descrito para productos de pescado, sustitutos y alternativas de carne, productos de queso (procesados), arroz hervido, fideos, yogur y productos lácteos (congelados). Se describen ejemplos de aplicaciones de transglutaminasa en las siguientes patentes: JP09206006 (arroz hervido), JP09154512 (fideos), JP092060031 (pescado), JP08224063 (gelificación proteica), JP08112071 (Tofu), JP08056597 (buena textura crujiente tras la fritura), JP07184554 (helado), WO 9520662 A (ostra japonesa), JP06261712 (cangrejo), EP 610649 (yogur), JP06153827 (arroz), WO9319610 (leche), JP02131537 (queso). Con frecuencia, el fin es modificar la textura del alimento, pero también se utiliza, por ejemplo, para aumentar el rendimiento del queso. Una desventaja de la transglutaminasa (microbiana) es su estabilidad térmica relativamente alta, la cual dificulta su inactivación completa en condiciones normales de procesamiento de alimentos, tales como pasteurización, esterilización o tratamiento térmico ultra alto. A 70°C, la inactivación de la enzima requiere 15 minutos y a 75°C todavía lleva 5 minutos (hoja de información de producto de Activa TG, Ajinomoto). Los tiempos de pasteurización normales son de 15-30 segundos a 72°C, los cuales son mucho más cortos que el tiempo necesario para la inactivación de la transglutaminasa. La inactivación de la enzima transglutaminasa es necesaria debido a las regulaciones sobre alimentos. El calentamiento prolongado a temperaturas elevadas es indeseado para muchas aplicaciones alimentarias porque conduce a la formación de sabores extraños y colores extraños resultantes, por ejemplo, de reacciones de Maillard. Se han descrito diversas clases de enzimas distintas como útiles para obtener reticulantes proteicos, incluidas lipoxigenasa, proteindisulfuroisomerasa, fenoloxidasa, peroxidasa, proteindisulfuro reductasas y tirosin oxidasas. Los ejemplos de sustratos para enzimas de reticulación proteica incluyen todas las proteínas derivadas de fuentes animales o vegetales, por ejemplo, gelatina, proteínas lácteas tales como lactosuero y caseína, proteína de soja, proteína de trigo, gluten, proteína de maíz, proteína de guisante y colágeno.

45 Unas pocas patentes describen el uso de lisil oxidasas. Los documentos JP02245166 y JP04094670 describen el uso de lisil oxidasa para modificar proteína de pescado para pasta de pescado. El documento DE1940069 describe la fabricación de un recubrimiento de proteína reticulada para sustancias activas en el que se utiliza lisil oxidasa para obtener la reticulación proteica. El documento JP007825 describe la preparación de un material de moldeado de láminas proteicas en el que se menciona la lisil oxidasa como un posible modo de reticular proteínas. El documento WO200307728 describe la preparación de productos alimentarios para vegetarianos a partir de proteína fúngica reticulada, en la que la transglutaminasa, proteindisulfuro isomerasa, sulfhidril oxidasa, diversas polifenil oxidasas, lisiloxidasa, peroxidasa y lipoxigenasa se mencionan como posibles enzimas de reticulación o proteína fúngica. El documento WO2004105485 describe la preparación de partículas de liberación lenta donde se menciona el posible uso de lisil oxidasa para la reticulación proteica. Estos ejemplos demuestran y respaldan el uso industrial de un lisil oxidasa.

#### Compendio de la invención

55 Se ha hallado de forma sorprendente que una única combinación de 5 motivos de secuencia de aminoácidos es capaz de identificar una nueva clase de lisil oxidasas microbianas excretadas con propiedades únicas. La clase de lisil oxidasas descrita en la presente memoria es única porque se excretan y porque tienen una preferencia por grupos amino en residuos lisil en péptidos o proteínas con respecto a grupos amino en sustratos de bajo peso molecular tales como bencil amina y triptamina.

En la presente memoria se describe:

(1) Lisil oxidasas de *Aspergillus nidulans*, *Cryptococcus neoformans*, *Podospora anserina* y *Fusarium graminearum*;

5 (2) Lisil oxidasas que contiene el siguiente motivo de aminoácido (los residuos entre paréntesis indican redundancia admitida en dicho punto, los aminoácidos están en código de 1 letra): I-H-D-[NS]-L-S-G-S-M-H-D-H-V-[IL]-N-F-K (SEQ\_ID NO:11)

(3) una secuencia de ADN que codifica para una lisil oxidasa de (1) o (2);

(4) un vector de expresión que comprende una secuencia de ADN de (3);

(5) una célula hospedadora que comprende un vector de expresión de (4); y

10 (6) un proceso para identificar enzimas nuevas que mejoran la textura y rendimiento que comprende someter a barrido una secuencia de aminoácidos para determinar la presencia del motivo de (2).

(7) Un proceso para preparar intermediarios proteicos reactivos que pueden activarse mediante una etapa de calentamiento para formar un gel proteico.

15 Las lisil oxidasas descritas en la presente memoria son capaces de catalizar la desaminación oxidativa de grupos lisil en una proteína o péptido en los correspondientes aldehídos, con la posterior reducción de O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se utilizan de forma ventajosa en la preparación de alimentos, piensos o productos nutracéuticos, o productos intermediarios de estos.

Una lisil oxidasa adecuada para uso en la invención es capaz de catalizar la desaminación oxidativa de grupos lisil en una proteína o péptido en los correspondientes aldehídos, con la posterior reducción de O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por la cual la lisil oxidasa

20 (a) muestra una relación entre actividad de lisil oxidasa para Ac-Gly-Lys-OMe y actividad de lisil oxidasa para bencilamina de al menos 1,1, preferiblemente al menos 1,3, más preferiblemente de al menos 1,4, donde las actividades se determinan a 37 grados Celsius y un pH de 7,0; y

(b) tiene una actividad óptima a una temperatura de entre 0 y 60 grados Celcius, y el uso preferido de la misma es en la preparación de alimentos, piensos o productos nutracéuticos, o productos intermediarios de estos.

25 Por consiguiente, la invención proporciona el uso de un polipéptido que tiene actividad de lisil oxidasa u que comprende el siguiente motivo de aminoácido, los residuos entre paréntesis indican redundancia admitida en dicho punto, los aminoácidos están en código de 1 letra:

- I H D [N S] L S G S M H D H V [IL] N F K

30 para catalizar la desaminación oxidativa de grupos lisil en una proteína o péptido en los correspondientes aldehídos, con la posterior reducción de O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Dicho polipéptido puede utilizarse en la preparación de alimentos, piensos o productos nutracéuticos, o productos intermediarios de estos.

En otro aspecto de la invención se proporciona el uso de un polipéptido que tiene actividad de lisil oxidasa, seleccionado del grupo que consiste en:

35 (a) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 60 % de identidad secuencial con la secuencia de aminoácidos entera de cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 4;

(b) un polipéptido que se codifica mediante un polinucleótido que hibrida en condiciones de baja rigurosidad con (i) la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 6 o (ii) una secuencia de ácido nucleico complementaria a la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 6.

40 La lisil oxidasa se utiliza de forma ventajosa para la preparación de un alimento o pienso o nutracéutico o para la preparación de un producto intermediario para la preparación de un alimento o pienso o nutracéutico.

Según un aspecto adicional de la invención se proporciona un método para la producción de lisil oxidasa que comprende cultivar una célula hospedadora que comprende una construcción de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica para la lisil oxidasa que comprende la secuencia de aminoácidos:

45 - I H D [N S] L S G S M H D H V [IL] N F K;

en condiciones adecuadas para la producción de la lisil oxidasa; y recuperar la lisil oxidasa.

La presente invención también se refiere a un proceso para identificar nuevas lisil oxidasas que comprende someter a barrido una secuencia de aminoácidos para determinar la presencia de las secuencias de aminoácidos:

- I H D [N S] L S G S M H D H V [IL] N F K.

5 Además, la invención proporciona un proceso para modificar un producto alimentario o de pienso que contiene una proteína o péptido, dicho método comprende modificar el producto alimentario o de pienso poniéndolo en contacto con una lisil oxidasa tal como se describe en la presente memoria o una composición enzimática que comprende la lisil oxidasa descrita en la presente memoria.

10 El código de una letra de los aminoácidos utilizado en la presente memoria se conoce comúnmente en la técnica y puede encontrarse en Sambrook, et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

15 Un aspecto de la presente invención es la sobreexpresión de lisil oxidasas secretadas cuando se utilizan las secuencias descritas en la presente memoria. Además, proporcionamos un motivo de secuencia que puede utilizarse para identificar y seleccionar lisil oxidasas secretadas activas de diferentes hongos. Utilizando este abordaje logramos seleccionar y expresar lisil oxidasas de *Aspergillus nidulans*, *Fusarium graminearum*, *Podospora anserina* y *Cryptococcus neoformans*.

Las lisil oxidasas se inactivarán durante los procesos de pasteurización utilizados normalmente en la industria de alimentos.

20 El tratamiento de pasteurización puede llevar a cabo a una temperatura de al menos 75°C, preferiblemente al menos 80°C. En una realización, el tratamiento térmico se lleva a cabo a una temperatura entre 75°C y 145°C, en una realización preferida el tratamiento térmico se lleva a cabo a una temperatura entre 75°C y 120°C, en una realización todavía más preferida el tratamiento térmico se lleva a cabo a una temperatura entre 75°C y 100°C, en una realización incluso más preferida el tratamiento térmico se lleva a cabo entre 80°C y 90°C. La duración del tratamiento térmico puede ser cualquier tiempo adecuado para lograr la desactivación de la lisil oxidasa. En una realización, la duración del tratamiento térmico es de entre 1 segundo y 30 minutos. En una realización el tratamiento térmico se lleva a cabo a 75°C a 90°C grados durante 5 segundos a 30 minutos, en otra realización, el tratamiento térmico se lleva a cabo a 80°C a 90°C durante 2 segundos a 30 minutos, en una realización adicional el tratamiento térmico se lleva a cabo a 80°C a 145°C de 1 segundo a 20 minutos. El tratamiento térmico puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido en la técnica.

30 Por consiguiente, la enzima descrita en la presente memoria, cuando se incuba con proteínas, conduce a la modificación de la textura de los geles proteicos. La modificación se obtiene en un nuevo proceso de dos etapas. En la primera etapa la proteína se trata con la lisil oxidasa. La reticulación se obtiene en una segunda etapa en la que la proteína se calienta hasta al menos 75°C, preferiblemente 80°C. Antes de la reticulación, la proteína opcionalmente puede ultrafiltrarse, o secarse en condiciones de temperatura que no conducen a una reticulación proteica considerable (<1%). Las temperaturas de seco están preferiblemente por debajo de 60°C, más preferiblemente por debajo de 50°C y todavía más preferiblemente por debajo de 40°C. El tratamiento térmico puede coincidir con el tratamiento térmico utilizado para inactivar la enzima. La proteína reticulada resultante puede utilizarse como un ingrediente en alimentos o piensos y mejorar su textura.

Según otro aspecto de la invención, la enzima descrita en la presente memoria, cuando se incuba con proteínas, conduce a la modificación de la textura de los geles proteicos.

40 La presente invención también proporciona un proceso para la preparación de un aldehído reactivo en una proteína o péptido que comprende la desaminación oxidativa de lisil-amina de la proteína o péptido mediante una lisil oxidasa y preferiblemente concentrar y/o secar la proteína o péptido que contiene los aldehídos reactivos.

45 Además, la presente invención también proporciona un proceso para la preparación de una proteína o péptido reticulado que comprende tratar, preferiblemente mediante calentamiento, la proteína o péptido que comprende aldehídos reactivos, para reticular la proteína o péptido.

Una proteína o péptido que comprende aldehídos reactivos formados mediante desaminación oxidativa de lisil-amina de la proteína está preferiblemente en forma seca.

Descripción detallada de la invención

50 Un «péptido» u «oligopéptido» define en la presente memoria como una cadena de al menos dos aminoácidos que están ligados a través de enlace peptídicos. Los términos «péptido» y «oligopéptido» se consideran sinónimos (tal como se reconoce comúnmente) y cada término puede utilizarse de forma intercambiable según lo requiera el contexto.

Un «polipéptido» se define en la presente memoria como una cadena que comprende más de 30 residuos de aminoácidos. Todas las fórmulas o secuencias de (oligo) péptidos y polipéptidos en la presente memoria se escriben de izquierda a derecha en el sentido desde el extremo amínico hacia el extremo carboxílico, según la práctica habitual. El código de una letra de los aminoácidos utilizado en la presente memoria se conoce comúnmente en la técnica y puede encontrarse en Sambrook, et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

Proteína láctea significa, leche, leche desnatada, leche sin grasa, leche de mantequilla, yogur, leche en polvo disuelta en agua hasta la concentración proteica deseada, caseinato disuelto en agua hasta la concentración proteica deseada, opcionalmente con proteínas de lactosuero, una disolución de glicomacropéptido (GMP) de kappa-caseína o una combinación de estos. Hidrolizado significa el producto que se forma mediante la hidrólisis de la proteína (o en pocas palabras, hidrolizado proteico o proteína hidrolizada), el hidrolizado soluble en ácido que es la fracción soluble del hidrolizado proteico que también se describe en la presente memoria como composición que contiene péptido soluble o composición que comprende productos soluble), o una mezcla de un hidrolizado proteico y un hidrolizado soluble en ácido.

El término nutracéutico tal como se usa en la presente memoria denota la utilidad tanto en el campo de aplicación nutritivo como farmacéutico. Por lo tanto, las nuevas composiciones nutracéuticas que comprenden la composición de la invención pueden utilizarse como complemento para alimentos o bebidas y como formulaciones farmacéuticas o medicamentos para aplicación entérica o parenteral que pueden ser formulaciones sólidas tales como cápsulas o comprimidos, o formulaciones líquidas, tales como soluciones, suspensiones o emulsiones.

Los sustratos adecuados para la reticulación según la invención son proteínas, péptidos, hidrolizados, proteínas o péptidos modificados y otros compuestos que tiene una funcionalidad de amina.

Las enzimas de reticulación que se describieron anteriormente establecen enlaces covalentes entre moléculas proteicas. La enzima transglutaminasa cataliza la formación de enlaces directamente utilizando residuos de glutamina y lisina. Los efectos de la acción de la transglutaminasa a menudo se ven de forma inmediata, por ejemplo, como un aumento en la viscosidad o una mejora y firmeza (textura mejorada) (véase, por ejemplo, Información técnica de Ajinomoto: Activa@WM, Das enzym mit biss; Boletín informativo Thought TNO, TNO Research Institute, Países Bajos, No. 25, Octubre de 1998, página 3) y no requieren etapas de procesamiento adicionales para obtener los retículos. Otras estrategias de reticulación enzimática donde se utilizan, por ejemplo, enzimas que generan sulfhidrilo oxidasa o peróxido de hidrógeno también conducen a la reticulación proteica sin requerir etapas de procesamiento adicionales. Lo mismo sucede con las lisil oxidasas, que generan una función de aldehído reactivo mediante su acción en residuos de lisina en proteínas, y la aplicación de estas proteínas modificadas se ha descrito, por ejemplo, en EP 0988859. En esta solicitud de patente se describe el uso de lisil oxidasa para obtener reticulación proteica. Los autores indican específicamente que la proteína modificada debería tratarse a temperaturas por debajo de 80°C, preferiblemente por debajo de 60°C. Aparentemente, no se necesita el tratamiento térmico para obtener la reticulación proteica. La disolución de proteínas reticuladas a menudo muestra viscosidad aumentada y capacidad de unión a agua aumentada, en comparación con las proteínas no reticuladas en condiciones similares. Esta es una desventaja cuando las proteínas reticuladas deben procesarse adicionalmente antes del envío desde el proveedor de ingredientes a los usuarios tales como fabricantes de alimentos. La proteína reticulada es más difícil de manipular y más difícil de procesar (por ejemplo, filtración) debido a la alta viscosidad de la disolución que contiene la proteína reticulada; además otras etapas de procesamiento como por ejemplo el secado se vuelven más difíciles y costosas cuando se manipulan proteínas reticuladas. El proceso de secado de las proteínas reticuladas requiere más energía en comparación con el de las proteínas no reticuladas debido a que tiene mejor capacidad de unión al agua. Sería de interés que los intermediarios de proteína reactiva pudieran prepararse a partir del sustrato de proteína de partida que se reticula fácilmente en la aplicación cuando se desee. Evitaría la formación de preparaciones viscosas y de alta unión a agua en el sitio del fabricante de alimentos, evitando costes de operación y manipulación excesivos. Los intermediarios de proteína reactiva requieren la modificación (funcionalización) de los sustratos de proteína de partida. En la presente solicitud de patente mostramos que de forma sorprendente las proteínas modificadas con las lisil oxidasas descritas en la presente solicitud tienen características de dichos intermediarios de proteína reactiva. Las proteínas tales como proteínas de lactosuero y caseína que se modifican con la lisil oxidasa no exhiben viscosidad aumentada. Cuando las proteínas funcionalizadas posteriormente se calientan, los intermediarios de proteína reactiva forman retículos proteicos, que conducen a viscosidad aumentada de las soluciones proteicas y textura aumentada.

Tal como se indicó anteriormente, se han descrito diversas lisil oxidasas en la literatura. La mayoría son de origen mamífero y no se han expresado a niveles elevados debido a sus características de solubilidad escasa (Kuchar & Dooley, J Inorg Biochem (2001) 83, 193-204). Además, la lisil oxidasa de *Pichia pastoris* se expresa escasamente (10 mg/L, Kuchar & Dooley, J Inorg Biochem (2001) 83, 193-204) y esta enzima también se produce de forma intracelular. EP 1 466 979 describe una alegada lisil oxidasa, pero hemos argumentado anteriormente que creemos que no se trata de una lisil oxidasa. Además, demostramos en el ejemplo 1 que la clonación y expresión de la lisil oxidasa descrita en EP 1 466 979 (SEQ\_ID NO: 2 en dicha patente) no conduce a la producción de actividad de lisil oxidasa.

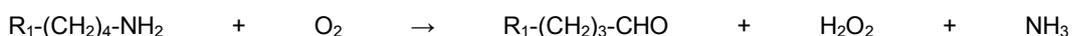
Hallamos de forma sorprendente que los polipéptidos que contienen el motivo de secuencia de aminoácidos SEQ\_ID NO:11 codifican para lisil oxidasas fúngicas activas que se secretan desde la célula al medio de cultivo. Proporcionamos cuatro ejemplos de dichas lisil oxidasas. La secuencia de lisil oxidasas ZGR se obtiene de *Aspergillus nidulans* (SEQ\_ID NO 1 y 6 codifican para la secuencia de aminoácidos y un gen sintético que codifica para esta proteína respectivamente); la lisil oxidasas ZGT se obtiene de *Cryptococcus neoformans* (SEQ\_ID NO 2 y 7 codifican para la secuencia de aminoácidos y un gen sintético que codifica para esta proteína respectivamente); la lisil oxidasas GLO1 se obtiene de *Fusarium graminearum* (SEQ\_ID NO 3 y 8 codifican para la secuencia de aminoácidos y la secuencia de ADN genómico que codifica para esta proteína respectivamente); la lisil oxidasas ZGY se obtiene de *Podospora anserina* (SEQ\_ID NO 4 y 9 codifican para la secuencia de aminoácidos y un gen sintético que codifica para esta proteína respectivamente). De forma sorprendente, también se produjo un polipéptido que es altamente homólogo con estas cuatro proteínas, pero que no contiene el motivo de secuencia de aminoácidos de SEQ\_ID NO:11, pero no mostró la actividad enzimática deseada, a diferencia de las cuatro proteínas que sí contenían el motivo de secuencia de aminoácidos de SEQ\_ID NO:11. Esta amina oxidasas GLO2 se obtiene de *Fusarium graminearum* (SEQ\_ID NO 5 y 10 que codifican para la secuencia de aminoácidos y la secuencia de ADN genómico que codifica para esta proteína respectivamente). Las cuatro lisil oxidasas que se identificaron utilizando el motivo de secuencia de aminoácidos SEQ\_ID NO:11 tenían una preferencia mayor por los sustratos de lisina y las lisil oxidasas que carecen del motivo SEQ\_ID NO:11 tienen un espectro de actividad preferida menor. Aparentemente la búsqueda con el motivo de aminoácidos SEQ\_ID NO:11 identifica específicamente las lisil oxidasas con más actividad preferida en sustratos de lisina y es, por lo tanto, una nueva herramienta importante para la identificación de lisil oxidasas útiles.

El motivo SEQ\_ID NO:11 se ubica en el centro activo de la lisil oxidasas, cuando se superpone sobre la estructura proteica conocida de la lisil oxidasas de *Pichia pastoris* (Duff et al. (2003) *Biochemistry* 42, 15148-15157). Las dos histidinas en este motivo corresponden a H528 y H530 de la proteína lisil oxidasas de *Pichia pastoris*. Estas dos histidinas participan en la unión del átomo de cobre en el sitio activo de la enzima. Es muy concebible que las diferencias en este motivo de aminoácidos conduzcan a los cambios cerca o en el centro activo de la enzima, y por lo tanto, tengan un efecto sobre la actividad o especificidad de sustrato de la enzima. Se propone que mediante el uso de este motivo un experto en la técnica puede identificar lisil oxidasas fúngicas activas que son útiles para aplicación en alimentos y piensos.

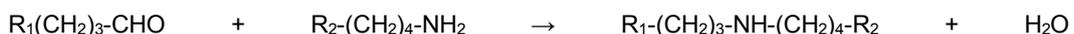
La capacidad de las enzimas descritas en la presente memoria para oxidar residuos de lisil en péptidos es de interés para aplicaciones industriales. Incluso es más ventajoso que las presentes enzimas son capaces de oxidar residuos de lisil en proteínas. Por lo tanto, las lisil oxidasas que tiene una alta preferencia por residuos de lisil en proteínas y péptidos en comparación con sustratos de bajo peso molecular como lisina libre o bencil amina se prefieren en la industria. Esta preferencia de sustrato es una ventaja importante y un parámetro para la selección de lisil oxidasas para uso industrial.

En la presente invención se muestra que de hecho es posible sobreexpresar lisil oxidasas secretadas con la especificidad de sustrato adecuado cuando se utilizan las secuencias correctas. Además, proporcionamos un motivo de secuencia que puede utilizarse para identificar y seleccionar lisil oxidasas secretadas activas de diferentes hongos. Utilizando este abordaje logramos seleccionar y expresar lisil oxidasas de *Aspergillus nidulans*, *Fusarium graminearum*, *Podospora anserina* y *Cryptococcus neoformans*.

Las lisil-oxidasas catalizan la desaminación oxidativa de grupos lisil en proteínas:



En esta reacción, R<sub>1</sub> es la cadena proteica de la cual es parte el residuo de lisina. El aldehído reactivo puede hacer reacción con un grupo amino libre de un segundo residuo de lisina:



De este modo, se forma un enlace covalente entre dos moléculas proteicas. En lugar de con un segundo residuos de lisina, el aldehído reactivo también puede hacer reacción con grupos amina disponibles distintos de los de los residuos de lisina proteicos para formar un enlace covalente. La reticulación de proteínas es especialmente útil para modificar la textura de alimentos. Los alimentos son materiales con múltiples componentes con estructuras y texturas complejas que son apreciadas por los consumidores. Una de las principales tareas de los tecnólogos de alimentos modernos es generar nuevas estructuras manipuladas a partir de un rango limitado de ingredientes que tienen características de sabor y textura aceptables (Dickinson, *Trends Food Sci technol* (1997) 8, 334-339). Las proteínas son una de las principales clases de bloques funcionales disponibles para los tecnólogos de alimentos para conferir atributos de textura semisólida y la reticulación y agregación de moléculas proteicas en redes tridimensionales (geles) es uno de los mecanismos más importantes para desarrollar estructuras con propiedades mecánicas deseables. Entre las diversas texturas de alimentos tradicionales que se basan predominantemente en geles proteicos están las del queso, yogur, salchicha, tofu (cuajada de soja) y surimi (gel de carne de pescado). Diversas interacciones tienen un papel en la formación del gel, tales como fuerzas hidrófobas, interacciones

electrostáticas, enlaces de hidrógeno e interacciones covalentes. Las últimas conducen a retículos permanentes en la red de gel. Las propiedades viscoelásticas y de fractura de un gel alimentario y, por consiguientes, su textura tal como la perciben los consumidores, dependen del equilibrio entre las fuerzas que estabilizan en el gel, incluidas las interacciones covalentes. Dado que las lisil-oxidasas pueden utilizarse para la formación de enlaces covalentes intramoleculares, son útiles para la modificación de la textura de los alimentos. Hallamos que la enzima, cuando se incubaba con proteínas, conduce a la modificación de la textura de los geles proteicos. Además, existe una necesidad en la industria de enzimas de reticulación proteica que se inactivan durante los procesos de pasteurización utilizados normalmente en la industria de alimentos. Mostramos que las lisil oxidasas descritas en la presente memoria cumplen con los criterios de labilidad térmica.

Un polipéptido que tiene actividad de lisil oxidasas puede estar en forma aislada. Tal como se define en la presente memoria, un polipéptido aislado es un polipéptido producido endógenamente o recombinante que está esencialmente libre de otros polipéptidos no lisil oxidasas y es típicamente al menos aproximadamente 20 % puro, preferiblemente al menos aproximadamente 40 % puro, más preferiblemente al menos aproximadamente 60 % puro, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 80 % puro, todavía más preferiblemente aproximadamente 90 % puro y más preferiblemente aproximadamente 95 % puro, tal como se determina mediante SDS-PAGE. El polipéptido puede aislarse mediante centrifugación y métodos cromatográficos, o cualquier otra técnica conocida en la técnica para obtener proteínas puras a partir de soluciones brutas. Se entenderá que el polipéptido puede mezclarse con vehículos o diluyentes que no interfieren con el objetivo previsto del polipéptido y, por consiguiente, el polipéptido de esta forma se considerará aun así como aislado. En general comprenderá el polipéptido en una preparación en la que más del 20 %, por ejemplo, más del 30 %, 40 %, 50 %, 80 %, 90 %, 95 % o 99 %, en peso de las proteínas de la preparación es un polipéptido para uso en la invención.

Preferiblemente, el polipéptido utilizado en la invención se puede obtener a partir de un microorganismo que posee un gen que codifica para una enzima con actividad de lisil oxidasas. Más preferiblemente, el polipéptido se secreta a partir de este microorganismo. Incluso más preferiblemente, el microorganismo es fúngico, y de forma óptima es un hongo filamentosos. Los organismos donantes preferidos son, por lo tanto, del género *Fusarium*, tales como los de la especie *Fusarium graminearum*, o del género *Aspergillus*, tales como los de la especie *Aspergillus nidulans*, del género *Cryptococcus*, tales como los de la especie *Cryptococcus neoformans* o del género *Podospora*, tales como los de la especie *Podospora anserina*.

La presente invención proporciona el uso de un polipéptido aislado que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene un grado de identidad de secuencia de aminoácidos con los aminoácidos 1 a 817 de la SEQ\_ID NO:1 (es decir, el polipéptido) de al menos 30 %, preferiblemente al menos 40 %, preferiblemente al menos 50 %, preferiblemente al menos 60 %, preferiblemente al menos 70 %, más preferiblemente al menos 80 %, incluso más preferiblemente al menos 90 %, todavía más preferiblemente al menos 95 % y más preferiblemente al menos 97 % y que tiene actividad de lisil oxidasas.

A los efectos de la presente invención, el grado de identidad entre dos o más secuencias de aminoácidos se determina mediante el programa de búsqueda en base de datos proteica BLAST P (Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Research 25: 3389-3402) con la matriz Blosum 62 y un umbral esperado de 10.

Un polipéptido utilizado en la invención puede comprender la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ\_ID NO:1 o una secuencia sustancialmente homóloga, o un fragmento de cualquier secuencia que tenga actividad de lisil oxidasas. En general, se prefiere la secuencia de aminoácidos de origen natural que se muestra en SEQ\_ID NO:1.

El polipéptido utilizado en la invención también puede comprender una variante o homólogo de especie de origen natural del polipéptido de SEQ\_ID NO:1.

Una variante es un polipéptido que se origina naturalmente en, por ejemplo, células fúngicas, bacterianas, de levadura o vegetales, la variante tiene actividad de lisil oxidasas y una secuencia sustancialmente similar a la proteína de SEQ\_ID NO:1. El término «variantes» hace referencia a polipéptidos que tienen el mismo carácter esencial o funcionalidad biológica básica que la lisil oxidasas de SEQ\_ID NO: 1 e incluye variantes alélicas. Preferiblemente, un polipéptido variante tiene al menos el mismo nivel de actividad de lisil oxidasas que el polipéptido de SEQ\_ID NO: 1. Las variantes incluyen variantes alélicas de la misma cepa que el polipéptido de SEQ\_ID NO: 1 o de una cepa diferente del mismo género o especie.

De forma similar, un homólogo de especie de la proteína de la invención es una proteína equivalente con secuencia similar que es una lisil oxidasas y se origina de forma natural en otras especies. Los ejemplos de homólogos de especie del polipéptido de SEQ\_ID NO: 1 se indican en SEQ\_ID NO: 2, 3 y 4.

Las variantes y homólogos de especie pueden aislarse utilizando los procedimientos descritos en la presente memoria que se utilizaron para aislar el polipéptido de SEQ\_ID NO: 1 y llevar a cabo dichos procedimientos en una célula fuente adecuada, por ejemplo, una célula bacteriana, de levadura, fúngica o vegetal. También es posible utilizar una sonda para sondear bibliotecas hechas con células de levadura, bacterianas, fúngicas o vegetales a efectos de obtener clones que expresan variantes u homólogos de especie del polipéptido de SEQ\_ID NO: 1. Los

métodos que pueden utilizarse para aislar variantes y homólogos de especie de un gen conocido se describen exhaustivamente en la literatura y son conocidos para los expertos en la técnica. Estos genes pueden manipularse mediante técnicas convencionales para generar un polipéptido para uso en la invención, que posteriormente puede producirse mediante técnicas recombinantes o sintéticas conocidas *per se*.

- 5 La secuencia del polipéptido de SEQ\_ID NO: 1 y de variantes y homólogos de especie también pueden modificarse para proporcionar polipéptidos para uso en la invención. Las sustituciones de aminoácidos pueden hacerse, por ejemplo, de 1, 2 o 3 hasta 10, 20 o 30 sustituciones. También puede hacerse la misma cantidad de supresiones e inserciones. Estos cambios pueden hacerse fuera de regiones esenciales para la función del polipéptido, de tal forma que el polipéptido modificado conserve su actividad de lisil oxidasa.
- 10 Los polipéptidos para uso en la invención incluyen fragmentos de los polipéptidos de longitud completa mencionados anteriormente y de variantes de los mismos, incluidos los fragmentos de la secuencia establecida en SEQ\_ID NO: 1. Dichos fragmentos típicamente conservarán la actividad de una lisil oxidasa. Los fragmentos pueden tener una longitud de al menos 50, 100 o 200 aminoácidos o pueden ser la sustracción de esta cantidad de aminoácidos de la secuencia de longitud completa que se muestra en SEQ\_ID NO: 1.
- 15 Los polipéptidos para uso en la invención, si es necesario, pueden producirse mediante medios sintéticos aunque habitualmente se producirán recombinantemente tal como se describe más adelante. Los polipéptidos sintéticos pueden modificarse, por ejemplo, mediante la adición de residuos de histidina o una etiqueta T7 para auxiliar en su identificación o purificación, o mediante la adición de una secuencia señal para promover su secreción a partir de una célula.
- 20 Por lo tanto, las secuencias variantes pueden comprender aquellas derivadas de cepas de *Aspergillus* distintas de la cepa de la cual se aisló el polipéptido de SEQ\_ID NO: 1. Las variantes se pueden identificar a partir de otras cepas de *Aspergillus* al buscar actividad de lisil oxidasa y clonarlas y secuenciarlas tal como se describe en la presente memoria. Las variantes pueden incluir la supresión, modificación o adición de aminoácidos simples o grupos de aminoácidos dentro de la secuencia proteica, siempre que el péptido mantenga la funcionalidad biológica básica de la lisil oxidasa de SEQ\_ID NO: 1.
- 25

Las sustituciones de aminoácidos pueden hacerse, por ejemplo, de 1, 2 o de 3 hasta 10, 20 o 30 sustituciones. El polipéptido modificado generalmente conservará la actividad de una lisil oxidasa. Se pueden hacer sustituciones conservadoras; dichas sustituciones se conocen en la técnica.

- 30 Las secuencias polipeptídicas más cortas están dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, un péptido de al menos 50 aminoácidos o hasta 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700 o 800 aminoácidos de longitud se considera que está dentro del alcance de la invención siempre que demuestre la funcionalidad biológica básica de la lisil oxidasa de SEQ\_ID NO: 1. En particular, pero no de forma exclusiva, este aspecto de la invención abarca la situación en la que la proteína es un fragmento de la secuencia proteica completa.

- 35 La presente invención también describe un polinucleótido que codifica para un polipéptido que tiene actividad de lisil oxidasa, dicho polinucleótido comprende

- (a) una secuencia de polinucleótidos que codifica para los aminoácido SEQ\_ID NO:1, y
- (b) una secuencia de polinucleótidos que codifica para los aminoácido SEQ\_ID NO:2, y
- (c) una secuencia de polinucleótidos que codifica para los aminoácido SEQ\_ID NO:3, y
- (d) una secuencia de polinucleótidos que codifica para los aminoácido SEQ\_ID NO:4.

- 40 Para la presente invención, los polipéptidos que contienen las secuencias consenso de lisil oxidasa de SEQ\_ID NO: 11 están dentro de la invención. Para la presente invención es especialmente relevante que la proteína de interés se secrete activamente en el medio de crecimiento. Las proteínas secretadas normalmente se sintetizan originalmente como preproteínas y la presecuencia (secuencia señal) se elimina posteriormente durante el proceso de secreción. El proceso de secreción es básicamente similar en procariotas y eucariotas: la preproteína secretada activamente se enrosca a través de una membrana, la secuencia señal se elimina mediante una peptidasa señal específica y la proteína madura se (re)pliega. También se puede reconocer una estructura general para la secuencia señal. Las secuencias señal para secreción se ubican en el extremo amínico de la preproteína y tienen generalmente 15-30 aminoácidos de longitud. El extremo amínico preferiblemente contiene aminoácidos cargados positivamente y preferiblemente ningún aminoácido ácido. Se cree que esta región cargada positivamente interactúa con los grupos principales cargados negativamente de los fosfolípidos de la membrana. A esta región le sigue una región central transmembranaria hidrófoba. Esta región generalmente tiene 10-20 aminoácido de longitud y consiste principalmente en aminoácidos hidrófobos. Los aminoácidos cargados normalmente no están presentes en esta región. A la región transmembranaria sigue el sitio de reconocimiento para la peptidasa señal. El sitio de reconocimiento consiste en aminoácidos con la preferencia por pequeño-X-pequeño. Los aminoácidos pequeños pueden ser alanina, glicina,
- 45
- 50

serina o cisteína. X puede ser cualquier aminoácido. Utilizando dichas reglas se puede escribir un algoritmo que es capaz de reconocer dichas secuencias señal en eucariotas y procariotas (Bendtsen, Nielsen, von Heijne and Brunak. (2004) J. Mol. Biol., 340:783-795). El programa SignalP para calcular y reconocer secuencias señal en proteínas está disponible en general (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

5 Es relevante para la presente invención que dichas secuencias señal pueden reconocerse a partir de la secuencia proteica deducida de un gen secuenciado. Si un gen codifica para una proteína donde una secuencia señal se predice utilizando el programa SignalP, la probabilidad de que dicha proteína se secrete es alta. Preferiblemente, por lo tanto, el propósito de la presente invención es proporcionar un nuevo método para encontrar nuevas proteínas que  
10 tienen actividad de lisil oxidasa utilizando la consenso de SEQ\_ID NO: 11, en combinación con la presencia de una secuencia señal detectada mediante el programa SignalP.

En una segunda realización, la presente invención proporciona el uso de un polipéptido aislado que tiene actividad de lisil oxidasa, y se codifica mediante polinucleótidos que hibridan o son capaces de hibridar en condiciones de rigurosidad baja, más preferiblemente condiciones de rigurosidad medias y más preferiblemente condiciones de rigurosidad alta, con (i) la secuencia de ácido nucleico de SEQ\_ID NO:6 o (ii) un fragmento de ácido nucleico que  
15 comprende al menos una porción de SEQ\_ID NO:6, o (iii) que tiene bases que difieren respecto de las bases de SEQ\_ID NO:6; o (iv) con una cadena de ácido nucleico complementaria a SEQ\_ID NO: 6.

La expresión «capaz de hibridar» significa que el polinucleótido objetivo puede hibridar con el ácido nucleico utilizado como sonda (por ejemplo, la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ\_ID NO: 6, o un fragmento de la misma, o el complemento de SEQ\_ID NO: 6, o un fragmento del mismo) a un nivel significativamente superior al ya  
20 registrado. La invención también incluye el uso de polinucleótidos que codifican para la lisil oxidasa descrita en la presente memoria, así como secuencias de nucleótidos que son complementarias a los mismos. La secuencia de nucleótidos puede ser ADN o ADN, incluido ADN genómico, ADN sintético o ADNc. Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos es ADN y más preferiblemente, una secuencia de ADN sintética. Típicamente, un polinucleótido utilizado en la invención comprende una secuencia contigua de nucleótidos que es capaz de hibridar en condiciones selectivas con la secuencia codificante o el complemento de la secuencia codificante de SEQ\_ID NO:6. Dichos  
25 nucleótidos se pueden sintetizar según métodos conocidos en la técnica.

Un polinucleótido utilizado en la invención puede hibridar con la secuencia codificante o el complemento de la secuencia codificante de SEQ\_ID NO: 6 a un nivel significativamente superior a lo ya registrado. Se puede producir hibridación ya registrada, por ejemplo, debido a otros ADNc presentes en una biblioteca de ADNc. El nivel de señal  
30 generado por la interacción entre un polinucleótido utilizado en la invención y la secuencia codificante o el complemento de la secuencia codificante de SEQ\_ID NO: 6 es típicamente al menos 10 veces, preferiblemente al menos 20 veces, más preferiblemente al menos 50 veces e incluso más preferiblemente al menos 100 veces, tan intenso como las interacciones entre otros polinucleótidos y la secuencia codificante de SEQ\_ID NO: 6. La intensidad de la interacción puede medirse, por ejemplo, mediante radioetiquetado de la sonda, por ejemplo, con  
35 <sup>32</sup>P. La hibridación selectiva típicamente se puede lograr utilizando condiciones de rigurosidad baja (0,3M de cloruro de sodio y 0,03M de citrato de sodio a aproximadamente 40 °C), rigurosidad media (por ejemplo, 0,3M de cloruro de sodio y 0,03M de citrato de sodio a aproximadamente 50 °C) o rigurosidad alta (por ejemplo, 0,3M de cloruro de sodio y 0,03M de citrato de sodio a aproximadamente 60 °C).

Un polinucleótido utilizado en la invención también incluye genes sintéticos que pueden codificar para el polipéptido de SEQ\_ID NO: 1, SEQ\_ID NO: 2, SEQ\_ID NO: 3 o SEQ\_ID NO: 4 o variantes de las mismas. Algunas veces es preferible adaptar el uso del codón de un gen al sesgo preferido en un hospedador de producción. Las técnicas para  
40 diseñar y construir genes sintéticos están disponibles en general (es decir, <http://www.dnatwopointo.com/>).

#### Modificaciones

Los polinucleótidos utilizados en la invención pueden comprender ADN o ARN. Pueden ser mono o bicatenarios.  
45 También pueden ser polinucleótidos que incluyen dentro de sí nucleótidos sintéticos o modificados incluidos ácidos nucleicos peptídicos. Varios tipos de modificaciones diferentes a los polinucleótidos se conocen en la técnica. Estos incluyen un esqueleto de metilfosfonato y fosforotioato, y adición de cadenas de acridina o polilisina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. A los efectos de la presente invención, se entenderá que los polinucleótidos descritos en la presente memoria pueden modificarse mediante cualquier método disponible en la técnica.

50 Se entenderá que los expertos en la técnica pueden, utilizando técnicas de rutina, hacer sustituciones de nucleótidos que no afectan la secuencia polipeptídica codificada por los polinucleótidos utilizados en la invención para reflejar el uso de codón de cualquier organismo hospedador específico en el que se expresarán los polipéptidos de la invención.

La secuencia codificante de SEQ\_ID NO: 6 puede modificarse mediante sustituciones de nucleótidos, por ejemplo,  
55 de 1, 2 o 3 hasta 10, 25, 50, 100 o más sustituciones. El polinucleótido de SEQ\_ID NO: 6 alternativamente o adicionalmente puede modificarse mediante una o más inserciones y/o supresiones y/o mediante una extensión en cualquiera o ambos extremos. El polinucleótido modificado en general codifica para un polipéptido que tiene

actividad de lisil oxidasa. Se pueden hacer sustituciones redundantes y/o se pueden hacer sustituciones que resultarían en una sustitución de aminoácidos conservadora cuando la secuencia modificada se traduce, por ejemplo, tal como se trata en referencia a los polipéptidos más adelante.

#### Homólogos

- 5 Una secuencia de nucleótidos que es capaz de hibridar selectivamente con el complemento de la secuencia codificante de ADN de SEQ\_ID NO: 6 se incluye en la invención y tendrá generalmente al menos 50 % o 60 %, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia codificante de SEQ\_ID NO: 6 en una región de al menos 60, preferiblemente al menos 100, más preferiblemente al menos 200 nucleótidos contiguos o más preferiblemente en la longitud completa de
- 10 SEQ\_ID NO:6. Asimismo, un nucleótido que codifica para una lisil oxidasa y que es capaz de hibridar selectivamente con un fragmento de un complemento de la secuencia codificante de ADN de SEQ\_ID NO: 6, también se incluye en la invención. Cualquier combinación de los grados de identidad y tamaños mínimos mencionados anteriormente puede utilizarse para definir polinucleótidos adecuados para uso en la invención, prefiriéndose las combinaciones más rigurosas (es decir, la identidad más alta en las longitudes más extensas). Por lo tanto, por ejemplo, un
- 15 polinucleótido que es al menos 80 % o 90 % idéntico en 60, preferiblemente en 100 nucleótidos, puede utilizarse en la invención, tal como un polinucleótido que es al menos 90 % idéntico en 200 nucleótidos.

Los algoritmos BLASTP y BLAST N se pueden utilizar para calcular la identidad de secuencia o alinear las secuencias (tal como identificar secuencias equivalentes o correspondientes, por ejemplo, en sus configuraciones predeterminadas).

- 20 El programa informático para llevar a cabo los análisis con BLAST se encuentra públicamente disponible a través del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica identificar primero los pares de secuencias con alto valor (HSP, por sus siglas en inglés) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia consultada que corresponden o satisfacen algún valor umbral positivo T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se refiere a la
- 25 puntuación umbral de la palabra más próxima. Estos resultados iniciales de la palabra más próxima actúan como punto de partida para iniciar las búsquedas para encontrar HSP que las contengan. Los resultados de la palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta el grado en que pueda incrementarse el valor de alineamiento acumulativo. Las extensiones de los resultados de la palabra en cada dirección se detienen cuando: el valor de alineamiento acumulativo desciende por la cantidad X del valor máximo logrado; el valor acumulativo disminuye a cero o menos, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos de valor negativo; o se alcanza el final de alguna secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLASTN para la comparación ADN-ADN usa por defecto una longitud de
- 30 palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10 y una comparación de ambas cadenas. El programa BLASTP para la comparación proteína-proteína utiliza como predeterminados una longitud de palabra (W) de 3, la matriz de puntaje BLOSUM62, una penalización por existencia de espacio de 11 con una penalización de extensión de espacio de 1 y una expectativa (E) de 10.

- El algoritmo BLAST lleva a cabo un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias. Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña ( $P(N)$ ), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos
- 40 ocurriría por casualidad. Por ejemplo, una secuencia se considera similar a otra secuencia si la probabilidad de suma más pequeña en comparación de la primera secuencia con la segunda secuencia es menor que alrededor de 1, preferiblemente menor que alrededor de 0,1, más preferiblemente menor que alrededor de 0,01 y más preferiblemente menor que alrededor de 0,001.

#### Cebadores y sondas

- 45 Los polinucleótidos tales como se describen en la presente memoria incluyen y pueden utilizarse como cebadores, por ejemplo, como cebadores de reacción de cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), como cebadores para reacciones de amplificación alternativas, o como sondas, por ejemplo, etiquetadas con una etiqueta reveladora mediante medios convencionales utilizando etiquetas radioactivas o no radioactivas, o los polinucleótidos se pueden clonar en vectores. Dichos cebadores, sondas y otros fragmentos tendrán al menos 15, por ejemplo, al
- 50 menos 20, 25, 30 o 40 nucleótidos de longitud. Típicamente serán hasta 40, 50, 60, 70, 100, 150, 200 o 300 nucleótidos de longitud o incluso hasta unos pocos nucleótidos (tales como 5 o 10 nucleótidos) más cortos que la secuencia codificante de SEQ\_ID NO:6.

- En general, los cebadores se producirán mediante medios sintéticos, que implican la fabricación en etapas de la secuencia de ácido nucleico deseado un nucleótido a la vez. Las técnicas para lograrlo y los protocolos están
- 55 disponibles en la técnica. Los polinucleótidos más largos se producirán en general utilizando medios recombinantes, por ejemplo, utilizando técnicas de clonación por PCR. Esto implicará producir un par de cebadores (típicamente de aproximadamente 15-30 nucleótidos) para amplificar la región deseada de la lisil oxidasa que se clonará, poner en contacto los cebadores con ARNm, ADNc o ADN genómico obtenido de una célula de levadura, bacteriana, vegetal,

procarionta o fúngica, preferiblemente de una cepa de *Aspergillus*, llevar a cabo una reacción en cadena de la polimerasa en condiciones adecuadas para la amplificación de la región deseada, aislar el fragmento amplificado (por ejemplo, al purificar la mezcla de reacción sobre un gel de agarosa) y recuperar el ADN amplificado. Los cebadores pueden diseñarse para contener sitios de reconocimiento de enzima de restricción adecuados de forma que el ADN amplificado pueda clonarse en un vector de clonación adecuado.

Alternativamente, se pueden construir genes sintéticos que abarcan la región codificante de la lisil oxidasa secretada o variantes de la misma. Los polinucleótidos que se alteran en muchas posiciones, pero que todavía codifican la misma proteína pueden diseñarse convenientemente y construirse utilizando estas técnicas. Esto tiene la ventaja de que el uso del codón puede adaptarse al hospedador de expresión preferido, de forma de que se puede mejorar la productividad de la proteína en este hospedador. Además, la secuencia de polinucleótidos de un gen se puede cambiar para mejorar la estabilidad del ARNm o reducir el recambio. Esto puede conducir a una expresión mejorada de la proteína deseada o variantes de la misma. Además, se puede cambiar la secuencia de polinucleótidos en un gen sintético para producir mutaciones en la secuencia proteica que tienen un efecto positivo sobre la eficacia de la secreción, estabilidad, vulnerabilidad proteolítica, temperatura óptima, actividad específica u otras propiedades relevantes para la producción industrial o aplicación de la proteína. Las empresas que proporcionan servicios para construir genes sintéticos y optimizar el uso de codones están disponibles en general.

Dichas técnicas pueden utilizarse para obtener todos o parte de los polinucleótidos que codifican para las secuencias de lisil oxidasa descritas en la presente memoria. Los intrones, promotores y regiones remolque están dentro del alcance de la invención y también pueden obtenerse de forma análoga (por ejemplo mediante medios recombinante, PCR o técnicas de clonación), partiendo de ADN genómico de una célula fúngica, de levadura, bacteriana, vegetal o procarionta.

Los polinucleótidos o cebadores pueden portar una etiqueta reveladora. Las etiquetas adecuadas incluyen radioisótopos tales como  $^{32}\text{P}$  o  $^{35}\text{S}$ , etiquetas fluorescentes, etiquetas enzimáticas u otras etiquetas proteicas tales como biotina. Dichas etiquetas pueden agregarse a los polinucleótidos o cebadores para uso en la invención y pueden detectarse utilizando técnicas conocidas para los expertos en la técnica.

Los polinucleótidos o cebadores (o fragmentos de los mismos) etiquetados o no etiquetados pueden utilizarse en pruebas basadas en ácido nucleico para la detección o secuenciación de una lisil oxidasa o una variante de la misma en una muestra fúngica. Dichas pruebas de detección comprenderán en general poner en contacto una muestra fúngica que se sospecha que contiene el ADN de interés con una sonda que comprende un polinucleótido o cebador descrito en la presente memoria en condiciones de hibridación y detectar cualquier dúplex formado entre la sonda y el ácido nucleico en la muestra. La detección puede lograrse utilizando técnicas tales como PCR o inmovilizando la sonda sobre un soporte sólido, eliminando cualquier ácido nucleico en la muestra que no hibridó con la sonda y detectando luego cualquier ácido nucleico que hibridó con la sonda. Alternativamente, el ácido nucleico de la muestra se puede inmovilizar en un soporte sólido, hibridar con la sonda y detectar la cantidad de sonda unida a dicho soporte tras la eliminación de cualquier sonda no unida.

Las sondas para uso en la invención pueden envasarse de modo conveniente en forma de un kit de prueba en un recipiente adecuado. En dichos kits, la sonda puede unirse con un soporte sólido cuando el formato del ensayo para el cual se diseñó el kit requiere dicha unión. El kit también puede contener reactivos adecuados para tratar la muestra que se va a someter a sondeo, para hibridar la sonda con ácido nucleico en la muestra, reactivos testigo, instrucciones y similares. Las sondas y polinucleótidos también se pueden utilizar en un microensayo.

Preferiblemente, el polinucleótido para uso en la invención se puede obtener del mismo organismo que el polipéptido, tal como un hongo, en particular un hongo del género *Aspergillus*.

#### Producción de polinucleótidos

Los polinucleótidos que no tienen 100 % de identidad con SEQ\_ID NO: 6 pero que pueden utilizarse en la invención pueden obtenerse de diversas formas. Por lo tanto, las variantes de la secuencia de lisil oxidasa descritas la presente pueden obtenerse, por ejemplo, sometiendo a sondeo bibliotecas de ADN genómico hecha con una gama de organismos, tales como los tratados como fuentes de los polipéptidos para uso en la invención. Además, otros homólogos fúngicos, vegetales o procariontas se pueden obtener y dichos homólogos y fragmentos de los mismos en general serán capaces de hibridar con SEQ\_ID NO: 6. Dichas secuencias pueden obtenerse sometiendo a sondeo bibliotecas de ADNc o bibliotecas de ADN genómico de otras especies y sometiendo a sondeo dichas bibliotecas con sondas que comprenden toda o parte de SEQ\_ID NO: 6 en condiciones de rigurosidad baja, media hasta alta (tal como se describió anteriormente). Las sondas de ácido nucleico que comprenden toda o parte de SEQ\_ID NO: 6 pueden utilizarse para someter a sondeo bibliotecas de ADNc o genómico de otras especies, tales como las descritas como fuentes para los polipéptidos para uso en la invención.

Los homólogos de especie también pueden obtenerse utilizando PCR redundante, que utiliza cebadores diseñados para dirigirse a secuencias dentro de variantes y homólogos que codifican para secuencias de aminoácidos conservadas. Los cebadores pueden contener una o más posiciones redundantes y se utilizarán en condiciones de

rigurosidad más bajas que las utilizadas para clonar secuencias con cebadores de secuencia simples contra secuencias conocidas. Un modo preferido de obtener homólogos de especie de lisil oxidasa es diseñar cebadores que se dirigen a secuencias que codifican para las secuencias consenso descritas en SEQ\_ID NO: 11.

5 Alternativamente, dichos polinucleótidos pueden obtenerse mediante mutagénesis dirigida al sitio de las secuencias de lisil oxidasa o variantes de las mismas. Esto puede ser útil, por ejemplo, cuando se necesitan cambios de codón silenciosos para optimizar las preferencias codónicas para una célula hospedadora específica en la cual se expresan las secuencias de polinucleótidos. Se pueden hacer otros cambios de secuencias a efectos de introducir sitios de reconocimiento de enzima de restricción o para alterar la propiedad o función de los polipéptidos codificados por los polinucleótidos.

10 Los polinucleótidos bicatenarios que comprenden un polinucleótido descritos en la presente memoria y su complemento pueden utilizarse en la invención.

15 En la presente memoria se describen polinucleótidos que codifican para los polipéptidos para uso en la invención descritos anteriormente. Dado que dichos polinucleótidos serán útiles como secuencias para la producción recombinante de polipéptidos para uso en la invención, no es necesario que sean capaces de hibridar con la secuencia de SEQ\_ID NO: 6, aunque esto será en general deseable. De otra forma, dichos polinucleótidos pueden etiquetarse, utilizarse y producirse tal como se describió anteriormente si se desea.

Polinucleótidos recombinantes.

20 En la presente memoria se describen vectores que comprenden un polinucleótido para uso en la invención, incluidos vectores de clonación y expresión, y en otro aspecto, métodos para cultivar, transformar o transfectar dichos vectores en una célula hospedadora adecuada, por ejemplo, en condiciones en las que se produce la expresión de un polipéptido para, o codificado por una secuencia para, uso en la invención. Además se proporcionan células hospedadoras que comprenden a polinucleótido o vector descrito en la presente memoria donde el polinucleótido es heterólogo para el genoma de la célula hospedadora. El término «heterólogo», generalmente con respecto a una célula hospedadora, significa que el polinucleótido no se produce de forma natural en el genoma de la célula hospedadora o que el polipéptido no se produce naturalmente a partir de dicha célula. Preferiblemente, la célula hospedadora es una célula de levadura, por ejemplo, una célula de levadura del género *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Hansenula* o *Saccharomyces* o una célula de hongo filamentoso, por ejemplo, del género *Aspergillus*, *Trichoderma* o *Fusarium*.

Vectores

30 El vector en el que el casete de expresión descrito en la presente memoria se inserta puede ser cualquier vector que se puede someter de forma conveniente a procedimientos de ADN recombinante y la elección del vector dependerá a menudo de la célula hospedadora en la que se va a introducir. Por lo tanto, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, tal como un plásmido. De manera alternativa, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula hospedadora, se integra en el genoma de la célula hospedadora y se replica junto con el o los cromosomas en el o los que se integró.

40 Preferiblemente, cuando un polinucleótido tal como se describe en la presente memoria está en un vector, está unido funcionalmente a una secuencia reguladora que es capaz de proporcionar la expresión de la secuencia codificante mediante la célula hospedadora, es decir, el vector es un vector de expresión. La expresión «unido funcionalmente» se refiere a una yuxtaposición donde los componentes descritos de esta manera están en una relación que les permite funcionar de la manera pretendida. Una secuencia reguladora tal como un promotor, potenciador u otra señal de regulación de expresión «unido funcionalmente» a una secuencia codificante se posiciona de tal forma que la expresión de la secuencia codificante se logra en condiciones de producción.

45 Los vectores, por ejemplo, en el caso de vectores de plásmido, cósmido, virus o fago, pueden proporcionarse con un origen de replicación, opcionalmente un promotor para la expresión del polinucleótido y opcionalmente un potenciador y/o regulador del promotor. La secuencia de terminación puede estar presente, tal como una secuencia de poliadenilación. Los vectores pueden contener uno o más genes marcadores seleccionables, por ejemplo, un gen de resistencia a la ampicilina en el caso de un plásmido bacteriano o un gen de resistencia a la neomicina para un vector mamífero. Los vectores pueden utilizarse *in vitro*, por ejemplo, para la producción de ARN o pueden utilizarse para transfectar o transformar una célula hospedadora.

50 La secuencia de ADN que codifica para el polipéptido se introduce preferiblemente en un hospedador adecuado como parte de una construcción de expresión en la cual la secuencia de ADN está unida funcionalmente con señales de expresión que son capaces de dirigir la expresión de la secuencia de ADN en las células hospedadoras. Para la transformación del hospedador adecuado con la construcción de expresión existen procedimientos de transformación disponibles conocidos para los expertos. La construcción de expresión se puede utilizar para la transformación del hospedador como parte de un vector que lleva un marcador seleccionable, o la construcción de

expresión se cotransforma como una molécula aparte junto con el vector que lleva un marcador seleccionable. Los vectores pueden contener uno o más genes marcadores seleccionables.

Los marcadores seleccionables preferidos incluyen, pero no se limitan a, aquellos que complementan un defecto en la célula hospedadora o confieren resistencia a un fármaco. Incluyen, por ejemplo, genes marcadores versátiles que pueden utilizarse para la transformación de la mayor parte de los hongos filamentosos y levaduras tales como genes acetamidasa o ADNc (los genes *amdS*, *niaD*, *facA* o ADNc de *A.nidulans*, *A.oryzae* o *A.niger*), o genes que proporcionan resistencia a antibióticos como resistencia a G418, higromicina, bleomicina, kanamicina, fleomicina o benomil (*benA*). Alternativamente, se pueden utilizar marcadores de selección específicos tales como marcadores auxótrofos que requieren las cepas hospedadoras mutantes correspondientes: por ejemplo, URA3 (de *S.cerevisiae* o genes análogos de otras levaduras), *pyrG* o *pyrA* (de *A.nidulans* o *A.niger*), *argB* (de *A.nidulans* o *A.niger*) o *trpC*. En una realización preferida, el marcador de selección se suprime de la célula hospedadora transformada después de la introducción de la construcción de expresión con el fin de obtener células hospedadoras transformadas capaces de producir el polipéptido que carecen de genes marcadores de selección.

Otros marcadores incluyen la subunidad 9 de ATP sintetasa (*oliC*), orotidina-5'-fosfato-decarboxilasa (*pvrA*), el gen de resistencia a G418 bacteriano (útil en levadura, pero no en hongos filamentosos), el gen de resistencia a ampicilina (*E. coli*), el gen de resistencia a neomicina (*Bacillus*) y el gen *uidA* de *E. coli*, que codifica para glucuronidasa (GUS). Los vectores pueden utilizarse *in vitro*, por ejemplo, para la producción de ARN o para transfectar o transformar una célula hospedadora.

Para la mayoría de los hongos filamentosos y levaduras, la construcción de expresión preferiblemente se integra en el genoma de la célula hospedadora a efectos de obtener transformantes estables. Sin embargo, para ciertas levaduras también están disponibles sistemas de vectores episomáticos adecuados en los cuales se puede incorporar la construcción de expresión para una expresión estable y a nivel elevado. Los ejemplos de los mismos incluyen vectores derivados de plásmidos de 2  $\mu$ m, CEN y *pKD1* de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, respectivamente, o vectores que contienen una secuencia AMA (por ejemplo, *AMA1* de *Aspergillus*). Cuando las construcciones de expresión se integran en los genomas de la célula hospedadora, las construcciones se integran en un loci aleatorio en el genoma, o en un loci objetivo predeterminado utilizando recombinación homóloga, donde en tal caso el loci objetivo comprende preferiblemente un gen expresado de forma elevada. Un gen expresado de forma elevada es un gen cuyo ARNm puede componer al menos 0,01 % (p/p) del ARNm celular total, por ejemplo, en condiciones inducidas o, alternativamente, un gen cuyo producto génico puede componer al menos 0,2 % (p/p) de la proteína celular total o, en caso de un producto génico secretado, puede secretarse a un nivel de al menos 0,05 g/l.

Una construcción de expresión para una célula hospedadora dada generalmente contendrá los siguientes elementos unidos funcionalmente entre sí en orden consecutivo desde el extremo 5' al extremo 3' con respecto a la cadena codificante de la secuencia que codifica para el polipéptido del primer aspecto: (1) una secuencia promotora capaz de dirigir la transcripción de la secuencia de ADN que codifica para el polipéptido en la célula hospedadora dada, (2) preferiblemente, una región no traducida en dirección a 5' (líder), (3) opcionalmente, a secuencia señal capaz de dirigir la secreción del polipéptido a partir de la célula hospedadora dada en el medio de cultivo, (4) la secuencia de ADN que codifica para una forma madura y preferiblemente activa del polipéptido y además preferiblemente (5) una región de terminación de la transcripción (terminador) capaz de terminar la transcripción posterior a la secuencia de ADN que codifica para el polipéptido.

Posteriormente a la secuencia de ADN que codifica para el polipéptido, la construcción de expresión preferiblemente contiene una región no traducida en dirección a 3' que contiene uno o más sitios de terminación de la transcripción, también denominado terminador. El origen del terminador es menos esencial. El terminador por ejemplo puede ser natural de la secuencia de ADN que codifica para el polipéptido. Sin embargo, preferiblemente se utiliza un terminador bacteriano en células hospedadoras bacterianas, se utiliza un terminador de levadura en células hospedadoras de levadura y se utiliza un terminador de hongo filamentososo en células hospedadoras de hongo filamentososo. Más preferiblemente, el terminador es endógeno con respecto a la célula hospedadora en la que se expresa la secuencia de ADN que codifica para el polipéptido.

También se puede lograr una expresión mejorada del polinucleótido que codifica para el polipéptido para uso en la invención mediante la selección de regiones reguladoras heterólogas, por ejemplo, regiones promotoras, de secuencia señal y terminador, que sirven para aumentar la expresión y, si se desea, los niveles de secreción de la proteína de interés del hospedador de expresión elegido y/o para proporcionar el control inducible de la expresión del polipéptido para uso en la invención.

Aparte del promotor natural para el gen que codifica para el polipéptido para uso en la invención, se pueden utilizar otros promotores para dirigir la expresión del polipéptido para uso en la invención. El promotor se puede seleccionar por su eficacia para dirigir la expresión del polipéptido para uso en la invención en el hospedador de expresión deseado.

- Los promotores/potenciadores y otras señales de regulación de la expresión pueden seleccionarse para que sean compatibles con la célula hospedadora para la cual se diseñó el vector de expresión. Por ejemplo, se pueden utilizar promotores procariotas, en especial aquellos adecuados para uso en cepas de *E.coli*. Cuando la expresión del polipéptido para uso en la invención se lleva a cabo en células de mamíferos, se pueden utilizar promotores de mamíferos. También se pueden utilizar promotores específicos para tejido, por ejemplo, promotor específico para hepatocito. Los promotores virales también pueden utilizarse, por ejemplo, la repetición terminal larga del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV LTR, por sus siglas en inglés), el promotor LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV, por sus siglas en inglés), el promotor de SV40, el promotor IE del citomegalovirus (CMV) humano, promotores del virus del herpes simple o promotores del adenovirus.
- 5
- 10 Los promotores de levadura adecuados incluyen los promotores GAL4 y ADH de *S. cerevisiae* y el promotor nmt1 y adh de *S. pombe*. Los promotores de mamíferos incluyen el promotor de la metalotioneína que puede inducirse en respuesta a metales pesados tales como cadmio. También se pueden utilizar promotores virales tales como el promotor de antígeno T grande de SV40 o promotores de adenovirus. Todos estos promotores están disponibles en la técnica.
- 15 Se pueden utilizar promotores de mamíferos tales como los promotores de  $\beta$ -actina. Los promotores específicos de tejido, en especial los promotores específicos de células endoteliales o neuronales (por ejemplo, los promotores DDAH1 y DDAH3) se prefieren especialmente. Los promotores virales también pueden utilizarse, por ejemplo, la repetición terminal larga del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV LTR), el promotor LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV), el promotor de SV40, el promotor IE del citomegalovirus (CMV) humano, adenovirus,
- 20 promotores de HSV (tales como los promotores IE de HSV) o promotores de HPV, en especial la región reguladora anterior del HPV (URR, por sus siglas en inglés). Los promotores virales están disponibles en la técnica.
- Se puede utilizar una variedad de promotores que son capaces de dirigir la transcripción en las células hospedadoras tal como se describe en la presente memoria. Preferiblemente, la secuencia promotora deriva de un gen expresado de forma muy elevada tal como se definió anteriormente. Los ejemplos de genes que se expresan de forma muy elevada preferidos de los cuales se derivan preferiblemente los promotores y/o que están comprendidos en el loci objetivo predeterminado preferido para la integración de las construcciones de expresión incluyen, pero no se limitan a, genes que codifican para enzimas glicolíticas tales como triosa-fosfato isomerasas (TPI), gliceraldehído-fosfato deshidrogenasas (GAPDH), fosfoglicerato cinasas (PGK), piruvato cinasas (PYK), alcohol deshidrogenasas (ADH), así como también genes que codifican para amilasas, glucoamilasas, proteasas, xilanasas, celobiohidrolasas,  $\beta$ -galactosidasas, alcohol (metanol) oxidasas, factores de alargamiento y proteínas ribosómicas.
- 25 Los ejemplos específicos de genes que se expresan de forma elevada adecuados incluyen, por ejemplo, el gen LAC4 de *Kluyveromyces* sp., los genes de metanol oxidasa (AOX y MOX) de *Hansenula* y *Pichia*, respectivamente, los genes de glucoamilasa (glaA) de *A.niger* y *A.awamori*, el gen de TAKA-amilasa de *A.oryzae*, el gen de gdpA de *A.nidulans* y los genes de celobiohidrolasa de *T.reesei*.
- 30 Los ejemplos de promotores fuertes constitutivos y/o inducibles que se prefieren para uso en hospedadores de expresión fúngica son aquellos que pueden obtenerse de los genes fúngicos para promotores de xilanasas (xlnA), fitasa, subunidad 9 de ATP-sintetasa (oliC), triosa fosfato isomerasa (tpi), alcohol deshidrogenasa (AdhA), amilasa (amy), amiloglucosidasa (AG - del gen glaA), acetamidasa (amdS) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (gpd).
- Los ejemplos de promotores de levadura fuertes que pueden utilizarse incluyen aquellos que se pueden obtener de los genes para alcohol deshidrogenasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, lactasa, 3-fosfoglicerato cinasa, ATPasa de membrana plasmática (PMA1) y triosafosfato isomerasa.
- 40 Los ejemplos de promotores bacterianos fuertes que pueden utilizarse incluyen los promotores de amilasa y SPo2 así como los promotores de genes de proteasa extracelular.
- Los promotores adecuados para células vegetales que pueden utilizarse incluyen promotores de napalina sintasa (nos), octopina sintasa (ocs), manopina sintasa (mas), subunidad pequeña de ribulosa (rubisco ssu), histona, actina de arroz, faseolina, 35S y 19S del virus del mosaico de la coliflor (CMV) y circovirus.
- 45 El vector puede incluir además secuencias que flanquean el polinucleótido que dan lugar a ARN que comprende secuencias homólogas a algunas de las secuencias genómicas eucariotas, secuencias genómicas fúngicas o secuencias genómicas de levadura. Esto permitirá la introducción de polinucleótidos tales como se describen en la presente memoria en el genoma de hongos o levaduras mediante recombinación homóloga. En especial, se puede utilizar un vector plasmídico que comprende el casete de expresión flanqueado por secuencias fúngicas para preparar un vector adecuado para suministrar los polinucleótidos descritos en la presente memoria a una célula fúngica. Las técnicas de transformación que utilizan estos vectores fúngicos son conocidas para los expertos en la técnicas.
- 50 El vector puede contener un polinucleótido tal como se describe en la presente orientado en un sentido complementario para proporcionar la producción de ARN complementario. El mismo se puede utilizar para reducir, si se desea, los niveles de expresión del polipéptido.
- 55

## Células hospedadoras y expresión

En un aspecto adicional, la invención proporciona un proceso para preparar un polipéptido para uso en la invención que comprende cultivar una célula hospedadora transformada o transfectada con un vector de expresión tal como se describió anteriormente en condiciones adecuadas para la expresión mediante el vector de una secuencia codificante que codifica para el polipéptido, y recuperar el polipéptido expresado. Los polinucleótidos tales como se describen en la presente memoria pueden incorporarse en un vector replicable recombinante tales como un vector de expresión. El vector puede utilizarse para replicar el ácido nucleico en una célula hospedadora compatible. En la presente memoria además se describe un método para producir un polinucleótido al introducir un polinucleótido tal como se describe en la presente memoria en un vector replicable, introducir el vector en una célula hospedadora compatible y cultivar la célula hospedadora en condiciones que provocan la replicación del vector. Las células hospedadoras adecuadas incluyen bacterias tales como *E. coli*, levadura, líneas celulares de mamíferos y otras líneas celulares eucariotas, por ejemplo, células de insectos tales como células Sf9 y células fúngicas (por ejemplo filamentosas).

Preferiblemente el polipéptido se produce como una proteína secretada en cuyo caso la secuencia de ADN que codifica para una forma madura del polipéptido en la construcción de expresión puede unirse funcionalmente con una secuencia de ADN que codifica para una secuencia señal. En el caso donde el gen que codifica para la proteína secretada tiene en la cepa natural una secuencia señal, preferiblemente la secuencia señal utilizada será natural (homóloga) para la secuencia de ADN que codifica para el polipéptido. Alternativamente, la secuencia señal es externa (heteróloga) para la secuencia de ADN que codifica para el polipéptido, en cuyo caso la secuencia señal es preferiblemente endógena para la célula hospedadora en la que se expresa la secuencia de ADN. Los ejemplos de secuencias señal adecuadas para células hospedadoras de levadura son las secuencias señal derivadas de genes MFalpha de levadura. De forma similar, una secuencia señal adecuada para células hospedadoras de hongo filamentoso es, por ejemplo, una secuencia señal derivada de un gen de amiloglucosidasa (AG) de hongo filamentoso, por ejemplo el gen *glaA* de *A.niger*. Esta secuencia señal puede utilizarse en combinación con el propio promotor de amiloglucosidasa (también denominada (gluco) amilasa), así como en combinación con otros promotores. También se pueden utilizar secuencias señal híbridas dentro del contexto de la presente invención.

Las secuencias líder de secreción heterólogas preferidas son aquellas que se originan del gen de amiloglucosidasa (AG) fúngico (*glaA*, las versiones de 18 y 24 aminoácidos, por ejemplo, de *Aspergillus*), el gen MFalpha (levaduras, por ejemplo, *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*) o el gen alfa-amilasa (*Bacillus*).

Los vectores pueden transformarse o transfectarse en una célula hospedadora adecuada tal como se describió anteriormente para proporcionar la expresión de un polipéptido para uso en la invención. Este proceso puede comprender cultivar una célula hospedadora transformada con un vector de expresión tal como se describió anteriormente en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido, y opcionalmente recuperar el polipéptido expresado.

También se describen en la presente memoria células hospedadoras transformadas o transfectadas con o que comprenden un polinucleótido o vector para uso en la invención. Preferiblemente, el polinucleótido se incluye en un vector que permite la replicación y expresión del polinucleótido. Las células se elegirán para ser compatibles con dicho vector y pueden ser por ejemplo células procariotas (por ejemplo, bacterianas), o eucariotas, fúngicas, de levadura o vegetales.

La invención abarca procesos para la producción de un polipéptido para uso en la invención por medio de expresión recombinante de una secuencia de ADN que codifica para el polipéptido. A estos efectos, la secuencia de ADN descrita en la presente memoria puede utilizarse para amplificación génica y/o intercambio de señales de expresión, tales como promotores, secuencias señal de secreción, a efectos de permitir una producción económica del polipéptido en una célula hospedadora homóloga o heteróloga adecuada. Una célula hospedadora homóloga se define en la presente memoria como una célula hospedadora que es de la misma especie o que es una variante dentro de la misma especie de la especie de la cual se derivó la secuencia de ADN.

Las células hospedadoras adecuadas son preferiblemente microorganismos procariotas tales como bacterias, o más preferiblemente organismos eucariotas, por ejemplo, hongos, tales como levaduras u hongos filamentosos o células vegetales. En general, se prefieren las células de levadura con respecto a las células de hongos filamentosos porque son más fáciles de manipular. Sin embargo, algunas proteínas se secretan escasamente a partir de levaduras, o en algunos casos no se procesan adecuadamente (por ejemplo, hiperglicosilación en levadura). En estos casos, se debe seleccionar un organismo hospedador de hongo filamentoso.

Las bacterias del género *Bacillus* son muy adecuadas como hospedadores heterólogos debido a su capacidad para secretar proteínas en el medio de cultivo. Otras bacterias adecuadas como hospedadores son aquellas de los géneros *Streptomyces* y *Pseudomonas*. Una célula hospedadora de levadura preferida para expresión de la secuencia de ADN que codifica para el polipéptido es una del género *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Yarrowia* o *Schizosaccharomyces*. Más preferiblemente, una célula hospedadora de levadura se selecciona del grupo que consiste en las especies *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* (también conocida como

*Kluyveromyces marxianus var. lactis*), *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica* y *Schizosaccharomyces pombe*.

5 Sin embargo, las más preferidas para expresión de la secuencia de ADN que codifica para el polipéptido son las células hospedadoras de hongo filamentoso. Las células hospedadoras de hongo filamentoso preferidas se seleccionan del grupo que consiste en los géneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Disporotrichum*, *Penicillium*, *Acremonium*, *Neurospora*, *Thermoascus*, *Myceliophthora*, *Sporotrichum*, *Thielavia* y *Talaromyces*. La célula hospedadora de hongo filamentoso más preferiblemente es de la especie *Aspergillus oyzae*, *Aspergillus sojae* o *Aspergillus nidulans* o es de una especie del Grupo *Aspergillus niger* (tal como lo definieron Raper and Fennell, The Genus *Aspergillus*, The Williams & Wilkins Company, Baltimore, pp 293-344, 1965). Las mismas incluyen, pero no se limitan a, *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus tubigensis*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus ficuum*, y también las de las especies *Trichoderma reesei*, *Fusarium graminearum*, *Penicillium chrysogenum*, *Acremonium alabamense*, *Neurospora crassa*, *Myceliophthora thermophilum*, *Sporotrichum cellulophilum*, *Disporotrichum dimorphosporum* y *Thielavia terrestris*.

15 Los ejemplos de hospedadores de expresión preferidos son hongos tales como la especie *Aspergillus* (en especial aquellos descritos en EP-A-184,438 y EP-A-284,603) y la especie *Trichoderma*; bacterias tales como de la especie *Bacillus* (en especial aquellas descritas en EP-A-134,048 y EP-A-253,455), especialmente las especies *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Pseudomonas*; y levaduras tales como la especie *Kluyveromyces* (en especial aquellas descritas en EP-A-096,430 tales como *Kluyveromyces lactis* y en EP-A-301,670) y la especie *Saccharomyces*, tales como *Saccharomyces cerevisiae*.

20 Las células hospedadoras incluyen células vegetales y, por lo tanto, se extienden a organismos transgénicos, tales como plantas y partes de las mismas, que contienen una o más de las células descritas en la presente. Las células pueden expresar de forma heteróloga el polipéptido para uso en la invención o pueden contener de forma heteróloga uno o más de los polinucleótidos descritos en la presente. La planta transgénica (o modificada genéticamente), por lo tanto, puede tener insertada (típicamente de forma estable) en su genoma una secuencia que codifica para los polipéptidos para uso en la invención. La transformación de células vegetales puede llevarse a cabo utilizando técnicas conocidas, por ejemplo, utilizando un plásmido Ti o Ri de *Agrobacterium tumefaciens*. Por consiguiente, el plásmido (o vector) puede contener secuencias necesarias para infectar una planta, y se pueden emplear derivados de los plásmidos de Ti y/o Ri.

25 La célula hospedadora puede sobreexpresar el polipéptido y son conocidas las técnicas para genomanipular la sobreexpresión. Por consiguiente, el hospedador puede tener dos o más copias del polinucleótido.

30 Alternativamente, se puede producir una infección de una parte de una planta, tal como una hoja, raíz o tallo. En esta técnica, la planta que se infectará puede lesionarse, por ejemplo, cortando la planta con una navaja, puncionando la planta con una aguja o frotando la planta con un abrasivo. A continuación se inocula la lesión con el *Agrobacterium*. Luego, la planta o parte de planta puede cultivarse en un medio de cultivo adecuado y dejarse desarrollar hasta convertirse en una planta madura. La regeneración de células transformadas en plantas modificadas genéticamente se puede lograr utilizando técnicas conocidas, por ejemplo, al seleccionar brotes transformados utilizando un antibiótico y subcultivar los brotes en un medio que contiene los nutrientes adecuados, hormonas vegetales y similares.

35 Cultivo de células hospedadoras y producción recombinante

En la presente memoria se describen células que han sido modificadas para expresar la lisil oxidasa o una variante de la misma. Dichas células incluyen líneas celulares eucariotas superiores modificadas de forma transitoria o preferiblemente de forma estable, tales como células de mamíferos o células de insectos, células eucariotas inferiores, tales como células de levadura y hongo filamentoso o célula procariotas tales como células bacterianas.

45 También es posible que los polipéptidos para uso en la invención se expresen de forma transitoria en una línea celular o en una membrana, tal como, por ejemplo, en un sistema de expresión de baculovirus. Dichos sistemas, que se adaptan para expresar las proteínas para uso en la invención también se describen en la presente memoria.

De acuerdo con la presente invención, la producción del polipéptido para uso en la invención se puede llevar a cabo cultivando hospedadores de expresión microbianos, que se han transformado con uno o más polinucleótidos tales como se describen en la presente memoria, en un medio de fermentación con nutrientes convencional.

50 Las células hospedadoras recombinantes pueden cultivarse utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Para cada combinación de un promotor y una célula hospedadora, están disponibles las condiciones de cultivo que pueden conducir a la expresión de la secuencia de ADN que codifica para el polipéptido. Luego de alcanzar la densidad o titulación celular deseada del polipéptido el cultivo se detiene y el polipéptido se recupera utilizando procedimientos conocidos.

El medio de fermentación puede comprender un medio de cultivo conocido que contiene una fuente de carbono (por ejemplo, glucosa, maltosa, molasas, etc.), una fuente de nitrógeno (por ejemplo, sulfato de amonio, nitrato de amonio, cloruro de amonio, etc.), una fuente de nitrógeno orgánica (por ejemplo, extracto de levadura, extracto de malta, peptona, etc.) y fuentes de nutrientes inorgánicas (tales como, fosfato, magnesio, potasio, cinc, hierro, etc.). Opcionalmente, se puede incluir o agregar posteriormente un inductor (dependiendo de la construcción de expresión utilizada).

La selección del medio apropiado puede basarse en la elección del hospedador de expresión y/o basarse en los requisitos de regulación de la construcción de expresión. Los medios adecuados son conocidos para los expertos en la técnica. Si se desea, el medio puede contener componentes adicionales que favorecen a los hospedadores de expresión transformados con respecto a otros microorganismos potencialmente contaminantes.

La fermentación se puede llevar a cabo durante un período de 0,5 a 30 días. La fermentación puede ser un proceso en lote, continuo o de lote alimentado a una temperatura adecuada en el rango de entre 0°C y 45°C y, por ejemplo, a un pH de 2 a 10. Las condiciones de fermentación preferidas incluyen una temperatura en el rango de entre 20 °C y 37 °C y/o un pH entre 3 y 9. Las condiciones adecuadas generalmente se seleccionan en base a la elección del hospedador de expresión y la proteína que se expresará.

Tras la fermentación, si es necesario, las células se pueden retirar del caldo de fermentación por medio de centrifugación o filtración. Luego de detener la fermentación o retirar la células, el polipéptido de la invención se puede recuperar y, si se desea, purificar y aislar mediante medios convencionales. La lisil oxidasa para uso en la invención puede purificarse a partir del micelio fúngico o a partir del caldo de cultivo en el que se libera la lisil oxidasa a partir de las células fúngicas cultivadas.

En una modalidad preferida el polipéptido se produce a partir de un hongo, más preferiblemente a partir de *Aspergillus*, más preferiblemente a partir de *Aspergillus niger*.

#### Modificaciones

Los polipéptidos para uso en la invención pueden modificarse de forma química, por ejemplo, se pueden modificar de forma postranslacional. Por ejemplo, pueden glicosilarse (una o más veces) o comprender residuos de aminoácidos modificados. También se pueden modificar mediante la adición de residuos de histidina para auxiliar en su purificación, o mediante la adición de una secuencia señal para promover su secreción a partir la célula. El polipéptido puede tener extensiones en el extremo amínico o carboxílico, tal como un residuo de metionina en el extremo amínico, un péptido conector pequeño de hasta aproximadamente 20-25 residuos, o una extensión pequeña que facilita la purificación, tal como un conducto de poli-histidina, un epítipo de antígeno o un dominio de unión.

Un polipéptido para uso en la invención puede etiquetarse con una etiqueta reveladora. La etiqueta reveladora puede ser cualquier etiqueta adecuada que permite detectar el polipéptido. Las etiquetas adecuadas incluyen radioisótopos, por ejemplo <sup>125</sup>I, <sup>35</sup>S, enzimas, anticuerpos, polinucleótidos y conectores tales como biotina.

Los polipéptidos pueden modificarse para incluir aminoácidos de origen no natural o para aumentar la estabilidad del polipéptido. Cuando las proteínas o péptidos se producen mediante medios sintéticos, dichos aminoácidos pueden introducirse durante la producción. Las proteínas o péptidos también pueden modificarse tras la producción sintético o recombinante.

Los polipéptidos para uso en la invención también pueden producirse utilizando aminoácidos D. En dichos casos los aminoácidos se enlazaran en secuencia inversa en el sentido de C a N. Esto es convencional en la técnica para producir dichas proteínas o péptidos.

Se conocen diversas modificaciones de cadena lateral en la técnica y se pueden hacer en las cadenas laterales de las proteínas o péptidos para uso en la presente invención. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, modificaciones de aminoácidos por medio de alquilación reductora mediante reacción con un aldehído y posteriormente mediante reacción con NaBH<sub>4</sub>, amidinación con metilacetimidato o acilación con anhídrido acético.

Las secuencias descritas en la presente memoria también pueden utilizarse como materiales de partida para la construcción de enzimas de «segunda generación». Las lisil oxidasas de «segunda generación» son lisil oxidasas alteradas mediante técnicas de mutagénesis (por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio o técnicas de transposiciones génicas) que tienen propiedades que difieren respecto de las de la lisil oxidasa natural o lisil oxidasa recombinante tales como las que se describen en la presente memoria. Por ejemplo, su temperatura o pH óptimo, actividad específica, afinidad de sustrato o termoestabilidad pueden alterarse a efectos de adaptarse mejor para el uso en un proceso específico.

Los aminoácidos esenciales para la actividad de la lisil oxidasa descrita en la presente memoria, y por lo tanto, preferiblemente sujetos a sustitución, pueden identificarse de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica,

tales como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis por barrido de alanina. En la última técnica, se introducen mutaciones en cada residuo en la molécula y las moléculas mutantes resultantes se someten a prueba para determinar su actividad biológica (por ejemplo, actividad de lisil oxidasa) para identificar residuos de aminoácidos que son esenciales para la actividad de la molécula. También se pueden determinar sitios de interacción entre enzima y sustrato mediante el análisis de la estructura de cristal que se determina mediante técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía o etiquetado por fotoafinidad.

Las técnicas de transposiciones génicas proporcionan un modo aleatorio de introducir mutaciones en una secuencia de polinucleótidos. Tras la expresión, los aislados con las mejores propiedades se vuelven a aislar, combinar y transponer para aumentar la diversidad genética. Al repetir este procedimiento una cantidad de veces, se pueden aislar los genes que codifican para proteínas mejoradas rápidamente. Preferiblemente el procedimiento de transposiciones génicas se inicia con una familia de genes que codifican para proteínas con una función similar. La familia de secuencias de polinucleótidos descrita en la presente memoria podría ser adecuada para las transposiciones génicas con el fin de mejorar las propiedades de las lisil oxidasas secretadas.

Alternativamente, se pueden utilizar las técnicas de mutagénesis aleatoria y selección clásicas, tales como mutagénesis con tratamiento NTG o mutagénesis UV para mejorar las propiedades de una proteína. La mutagénesis se puede llevar a cabo directamente en el ADN aislado o en células transformadas con el ADN de interés. Alternativamente, se pueden introducir mutaciones en ADN aislado mediante varias técnicas que son conocidas para los expertos en la técnica. Los ejemplos de métodos son PCR propensa a error, amplificación de ADN plasmídico en una célula hospedadora deficiente, etc.

Se espera que el uso de células hospedadoras de levadura y hongo filamentoso proporcione modificaciones postranscripcionales (por ejemplo, procesamiento proteolítico, miristilación, glicosilación, truncamiento y fosforilación de tirosina, serina o treonina) que pueden ser necesarias para conferir una actividad biológica óptima a los productos de expresión recombinantes para uso en la invención.

#### Preparaciones

Los polipéptidos para uso en la invención pueden estar en forma aislada. Se entenderá que el polipéptido puede mezclarse con vehículos o diluyentes que no interferirán con el objetivo previsto del polipéptido y todavía se considerará como aislado. Un polipéptido para uso en la invención también puede estar en forma sustancialmente purificada, en tal caso comprenderá en general el polipéptido en una preparación en la que más del 70 %, por ejemplo, más del 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de las proteínas en la preparación es un polipéptido tal como se describe en la presente memoria.

Los polipéptidos para uso en la invención se pueden proporcionar en una forma tal en la que están fuera de su ambiente celular natural. Por lo tanto, se pueden aislar o purificar sustancialmente, tal como se trató anteriormente, o pueden estar en una célula en la que no se genera naturalmente, por ejemplo, una célula de otra especie fúngica, de animales, plantas o bacterias.

35 Eliminación o reducción de la actividad de lisil oxidasa

En la presente memoria se describen métodos para producir una célula mutante de una célula genitora, que comprenden interrumpir o suprimir la secuencia de ácido nucleico endógena que codifica para el polipéptido o una secuencia de control de la misma, lo cual resulta en que la célula mutante produce menos del polipéptido que la célula genitora.

40 La construcción de cepas que tienen actividad de lisil oxidasa reducida se puede lograr de forma conveniente mediante la modificación o inactivación de una secuencia de ácido nucleico necesaria para la expresión de la lisil oxidasa en la célula. La secuencia de ácido nucleico que se va a modificar o inactivar puede ser, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que codifica para el polipéptido o una parte esencial del mismo para exhibir actividad de lisil oxidasa, o la secuencia de ácido nucleico puede tener una función reguladora necesaria para la expresión del polipéptido a partir de la secuencia codificante de la secuencia de ácido nucleico. Un ejemplo de dicha secuencia reguladora o de control puede ser una secuencia promotora o una parte funcional de la misma, es decir, una parte que es suficiente para afectar la expresión del polipéptido. Otras secuencias de control para una posible modificación incluyen, pero no se limitan a, una secuencia líder, una secuencia de poli-adenilación, una secuencia pro-peptido, una secuencia señal y una secuencia de terminación.

50 La modificación o inactivación de la secuencia de ácido nucleico puede llevarse a cabo sometiendo a la célula a mutagénesis y seleccionando las células en las que la capacidad de producir lisil oxidasa se ha reducido o eliminado. La mutagénesis, que puede ser específica o aleatoria, se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante el uso de cualquier agente de mutagénesis físico o químico adecuado, mediante el uso de un oligonucleótido adecuado o sometiendo la secuencia de ADN a mutagénesis por PCR. Además, la mutagénesis se puede llevar a cabo mediante el uso de cualquier combinación de estos agentes de mutagénesis.

Los ejemplos de un agente de mutagénesis físico o químico adecuada para el presente fin incluyen irradiación ultravioleta (UV), hidroxilamina, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG), O-metil hidroxilamina, ácido nitroso, etil metano sulfonato (EMS), bisulfito de sodio, ácido fórmico y análogos nucleotídicos.

5 Cuando se utilizan dichos agentes, la mutagénesis típicamente se lleva a cabo incubando la célula que se someterá a mutagénesis en presencia del agente de mutagénesis elegido en condiciones adecuadas y seleccionando las células que exhiben expresión reducida o ninguna expresión de la actividad de lisil oxidasa.

10 La modificación o inactivación de la producción de un polipéptido adecuado para uso en la presente invención se puede lograr mediante la introducción, sustitución o eliminación de uno o más nucleótidos en la secuencia de ácido nucleico que codifica para el polipéptido o un elemento regulador necesario para la transcripción o traducción del mismo. Por ejemplo, se pueden insertar o eliminar nucleótidos a efectos de resultar en la introducción de un codón de terminación, la eliminación del codón de inicio o un cambio en el marco de lectura abierto. Dicha modificación o inactivación se puede lograr mediante mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis por PCR de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica.

15 Aunque, en principio, la modificación se puede llevar a cabo *in vivo*, es decir, directamente en la célula que expresa la secuencia de ácido nucleico que se va a modificar, se prefiere que la modificación se lleve a cabo *in vitro* tal como se ejemplifica más adelante.

20 Un ejemplo de un modo conveniente para inactivar o reducir la producción de la lisil oxidasa por parte de una célula hospedadora elegida se basa en técnicas de reemplazo génico o interrupción génica. Por ejemplo, en el método de interrupción génica, una secuencia de ácido nucleico que corresponde al gen o fragmento de gen endógeno de interés se somete a mutagénesis *in vitro* para producir una secuencia de ácido nucleico defectuosa que luego se transforma en la célula hospedadora para producir un gen defectuoso. Mediante recombinación homóloga, la secuencia de ácido nucleico defectuosa reemplaza al gen o fragmento de gen endógeno. Preferiblemente, el gen o fragmento de gen defectuoso también codifica para un marcador que puede utilizarse para seleccionar los transformantes en los que se ha modificado o destruido el gen que codifica para el polipéptido.

25 Alternativamente, la modificación o inactivación de la secuencia de ácido nucleico que codifica para una polipéptido para uso en la presente invención puede lograrse mediante técnicas antisentido establecidas utilizando una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia que codifica para el polipéptido. Más específicamente, la producción del polipéptido por parte de una célula se puede reducir o eliminar mediante la introducción de una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de ácido nucleico que codifica para el polipéptido. El polinucleótido complementario a continuación típicamente se transcribirá en la célula y será capaz de hibridar con el ARNm que codifica para la lisil oxidasa. En condiciones que permiten que la secuencia de nucleótidos antisentido complementaria hibride con el ARNm, la cantidad de lisil oxidasa producida en la célula se reducirá o eliminará.

30 Se prefiere que la célula que se va a modificar según los métodos de la presente invención sea de origen microbiano, por ejemplo, una cepa fúngica que es adecuada para la producción de productos proteicos deseados, ya sean homólogos o heterólogos con respecto a la célula.

En la presente memoria se describe además una célula mutante de una célula genitora que comprende una alteración o supresión de la secuencia de ácido nucleico endógena que codifica para el polipéptido o una secuencia de control del mismo, que resulta en que la célula mutante produce menos del polipéptido que la célula genitora.

35 Las células mutantes deficientes para el polipéptido creadas de esta forma son particularmente útiles como células hospedadoras para la expresión de polipéptidos homólogos y/o heterólogos. Por lo tanto, existen métodos descritos en la presente memoria para producir un polipéptido homólogo o heterólogo que comprenden (a) cultivar la célula mutante en condiciones que conducen a la producción del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido. En el presente contexto, el término «polipéptidos heterólogos» se define en la presente memoria como polipéptidos que no son naturales con respecto a la célula hospedadora, una proteína natural en la que se han hecho modificaciones para alterar la secuencia natural o una proteína natural cuya expresión se ha alterado cuantitativamente como resultado de una manipulación de la célula hospedadora mediante técnicas de ADN recombinante.

40 También se describe en la presente memoria un método para producir un producto proteico esencialmente libre de actividad de lisil oxidasa mediante fermentación de una célula que produce un polipéptido de lisil oxidasa para uso en la presente invención así como el producto proteico de interés. El método comprende agregar una cantidad eficaz de un agente capaz de inhibir la actividad de lisil oxidasa en el caldo de fermentación durante o después de que se haya completado la fermentación, recuperar el producto de interés del caldo de fermentación y opcionalmente someter el producto recuperado a purificación adicional. Alternativamente, tras el cultivo el caldo de cultivo resultante se puede someter a un tratamiento de pH o temperatura tratamiento con el fin de reducir la actividad de lisil oxidasa sustancialmente, y permitir la recuperación del producto del caldo de cultivo. El tratamiento combinado de pH o temperatura puede llevarse a cabo en una preparación proteica recuperada del caldo de cultivo.

Los métodos descritos en la presente memoria para producir un producto esencialmente libre de lisil oxidasa son especial interés para la producción de polipéptidos eucariotas, en especial en la producción de proteínas fúngicas tales como enzimas. Las células deficientes para lisil oxidasa también pueden utilizarse para expresar proteínas heterólogas de interés para la industria de los alimentos, o de interés farmacéutico.

## 5 Motivos peptídicos para identificar genes

Se puede utilizar un motivo peptídico para identificar genes que codifican para proteínas que contienen este motivo peptídico. En lugar de un motivo peptídico, también se pueden utilizar una combinación de dos o más motivos peptídicos para identificar genes que codifican para proteínas que contienen los motivos peptídicos. Cuando se identifican uno o varios motivos peptídicos que codifican para lisil oxidasas específicas es posible, por lo tanto, identificar genes que codifican para lisil oxidasas utilizando uno o una combinación de varios de estos motivos peptídicos. Las lisil oxidasas se utilizan como un ejemplo de cómo pueden identificarse dichos genes, pero los métodos descritos se pueden aplicar en general. Una posibilidad es la de usar la secuencia del motivo de SEQ\_ID NO: 11 para buscar en secuencias de ADN traducidas de un banco de datos de ADN o secuencias proteicas de un banco de datos de secuencias proteicas mediante el uso de un programa como PatScan (<http://www-unix.mcs.anl.gov/compbio/PatScan/HTML/>). La secuencia de aminoácidos se debe ingresar en un formato especial que se describe en el sitio web. Otro método que se puede llevar a cabo es el de usar la secuencia del motivo de SEQ\_ID NO: 11 para buscar en secuencias de ADN traducidas de un banco de datos de ADN o secuencias proteicas de un banco de datos de secuencias proteicas mediante el uso de un programa como <http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/>. Para este programa el motivo se ingresa en el campo de búsqueda en el formato denominado Prosite y se busca en las bases de datos para presencia del motivo en la secuencia proteica o en la secuencia de ADN traducida. Este método se describe adicionalmente en el Ejemplo 1 de la presente invención, utilizando el motivo de aminoácidos de SEQ\_ID NO: 11, y se utiliza para identificar genes fúngicos que codifican para lisil oxidasas útiles. Los genes que se identifican utilizando uno de estos métodos luego pueden traducirse en una secuencia proteica utilizando programas conocidos para los expertos en la técnica e inspeccionarse para detectar la presencia de una secuencia señal en su extremo amínico. Para detectar una secuencia señal se puede utilizar un programa como SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). En la presente invención, hallamos que una secuencia proteica que contiene las secuencias consensos y una secuencia señal prevista es probablemente una lisil oxidasa secretada. Buscar estas propiedades combinadas proporciona una gran ventaja para la producción industrial de dicha enzima.

Otra posibilidad para identificar los genes de lisil oxidasa utilizando motivos peptídicos es diseñar cebadores de oligonucleótidos basados en la retrotraducción de la secuencia de aminoácidos del motivo de SEQ\_ID NO: 11 en una secuencia de nucleótidos con uso de codón preferido de un organismo en el que se quiere identificar un gen de lisil oxidasa y utilizar este oligonucleótido para hibridación con una biblioteca génica, o en un cebador de PCR en una concentración de ARNm transcrito de forma inversa. Mediante el uso del motivo de secuencia peptídica SEQ\_ID NO: 11, también es posible aislar genes que codifican para lisil oxidasa cuando la secuencia génica es desconocida. Se han descrito métodos en la literatura para diseñar cebadores de oligonucleótidos redundantes que pueden utilizarse para este fin (Sambrook et al. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press). Además, se han descrito métodos para aislar genes de un organismo utilizando un oligonucleótido redundante como sonda o cebador.

Los oligonucleótidos que codifican para el motivo peptídico de SEQ\_ID NO: 11 son útiles para aislar los genes que codifican para propiedades de lisil oxidasa. La redundancia de dicho grupo de oligonucleótidos puede reducirse mediante la introducción de bases de inosina (I) en las posiciones donde el nucleótido no se conoce. Además, las posiciones donde las bases citosina (C) y timidina (T) son posibles pueden reemplazarse por uracilo (U), y en las posiciones donde adenina (A) y guanina (G) son posibles se puede introducir solo guanina, a efectos de reducir la redundancia con apenas un pequeño efecto sobre la especificidad del cebador de oligonucleótidos. Además, para someter a barrido la presencia de genes que codifican para lisil oxidasas en organismos de los cuales se conocen la preferencia codónica, la redundancia de los oligonucleótidos puede reducirse adicionalmente tomando en cuenta la preferencia codónica en el diseño de los oligonucleótidos. Un experto en la técnica sabrá cómo hacerlo. Además, todas las combinaciones posibles de cebadores de oligonucleótidos, sin redundancia, pueden sintetizarse por separado y utilizarse en experimentos de barrido individuales.

En primer lugar, se construye una biblioteca genómica, de ADNc o EST a partir de las especies de interés en un vector universal. En la literatura se describen métodos adecuados para la construcción de bibliotecas (Sambrook et al. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press). En segundo lugar, se utiliza un oligonucleótido redundante descrito anteriormente en una reacción de PCR junto con un oligonucleótido universal que se ceba el vector, en el borde del inserto de ADN recombinante, en ADN aislado de la biblioteca. Se han descrito estrategias útiles en la literatura para aislar un gen deseado cuando solo hay disponible un cebador de oligonucleótido redundante simple (por ejemplo, Minambres et al. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272, 477-479; PCR technology (1989) Ed. H.A. Erlich pp. 99-104, Stockton Press). En tercer lugar, el fragmento amplificado por PCR a continuación se etiqueta y utiliza como sonda para someter a barrido la biblioteca mediante

medios convencionales. A continuación, el gen de longitud completa se puede subclonar en un vector de expresión adecuado para sobreexpresión de la lisil oxidasa en un organismo hospedador de producción deseado.

5 En un abordaje diferente, cuando no hay una biblioteca disponible de la especie para someter a barrido para detectar la presencia de un gen que codifica para una lisil oxidasa, parte del gen puede amplificarse mediante PCR con diferentes cebadores redundantes o con 3'-RACE utilizando un cebador redundante simple. Para este fin, se aísla ARN de la especie de interés y se utiliza en una reacción de 3'-RACE utilizando un cebador redundante simple como cebador específico del gen. La amplificación de parte de un ADNc desconocido utilizando un oligonucleótido redundante y un cebador universal mediante 3'-RACE, se ha descrito anteriormente (WO99/38956).

10 El método tradicional para aislar un gen de longitud completa utilizando la información de solo un péptido pequeño es la hibridación de un oligonucleótido redundante etiquetado con filtros en los que una biblioteca se replica. Los métodos que describen el barrido de bibliotecas génicas utilizando oligonucleótidos redundantes y los métodos para calcular o determinar las condiciones de hibridación óptimas de estos oligonucleótidos se han descrito exhaustivamente en la literatura (Sambrook et al.(1989)). Los oligonucleótidos descritos anteriormente pueden utilizarse para este método para aislar genes que codifican para una lisil oxidasa de diferentes especies.

15 En una variación de este método se puede construir primero una biblioteca génica parcial. Para este fin, se fracciona el ADN, a continuación se detectan los fragmentos de ADN que contienen el gen que codifica para la lisil oxidasa mediante hibridación con los oligonucleótidos etiquetados descritos anteriormente. Estos fragmentos se aíslan y utilizan en la construcción de una biblioteca génica parcial enriquecida con el gen que codifica para una lisil oxidasa. A continuación, esta biblioteca puede someterse a barrido mediante medios convencionales. Para este método, el ADN genómico primero se digiere con enzimas de restricción antes del fraccionamiento mediante electroforesis en gel, mientras que el ADNc puede fraccionarse directamente.

20 Un método diferente para aislar el gen que codifica para una lisil oxidasa es mediante el uso de anticuerpos activados contra cualquiera de los péptidos de la secuencia consenso. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. Los métodos que describen la producción de anticuerpos específicos para péptidos pequeños se han descrito exhaustivamente en la literatura (Harlow, E and Lane, D (1988) Anticuerpos; a laboratory manual, ISBN 0-87969-314. -2).

25 Se pueden construir bibliotecas de expresión de las especies de interés, al clonar ADNc o ADN genómico en un vector adecuado para expresar el inserto en un hospedador conveniente, tal como *E. coli* o levadura. Los vectores de expresión pueden o no basarse en fago lambda. La inmunodetección de antígenos producidos mediante bibliotecas de expresión y los métodos que describen la purificación de clones específicos que expresan el antígeno se han publicado. Mediante el uso de un anticuerpo específico para cualquiera de los péptidos del motivo consenso, es posible aislar el gen que codifica para una lisil oxidasa que abarca este motivo, utilizando este método.

30 De hecho, se pueden utilizar muchos métodos diferentes para aislar un gen que codifica para una lisil oxidasa cuando la información descrita en la presente invención se toma en cuenta. La ventaja de utilizar la información de secuencia de motivo peptídico con respecto a métodos de la técnica anterior es la velocidad y la relativa facilidad con la que se puede identificar un nuevo gen que codifica para una lisil oxidasa activa. El uso de la información de secuencia proporciona una indicación del valor de una nueva lisil oxidasa en la producción de queso, u otras aplicaciones en la industria de alimentos, sin llevar a cabo pruebas difíciles de todas las posibles oxidasas en experimentos de aplicación directos.

40 Demostraremos la invención en los ejemplos a continuación. Demostraremos la identificación, clonación, producción, purificación y caracterización bioquímica de las nuevas lisil oxidasas. Además demostraremos el uso de las lisil oxidasas en la preparación de productos alimentarios.

#### Leyendas de las figuras

45 Figura 1: Construcción de vectores de expresión de lisil oxidasa pGBFINZGR-1, pGBFINZGT-1, pGBFINGLO-1, pGBFINZGY-1 y pGBFINGLO-2. El gen de interés se etiqueta como Xxx en esta Figura cuyo código puede reemplazarse por cualquier de los códigos de la Tabla 1.

50 Figura 2: Perfiles de SDS-PAGE que muestran la expresión proteica de lisil oxidasas en *Aspergillus niger*. Las muestras se toman de sobrenadantes de cultivo y se manchan en SDS-PAGE (10% NUPAGE, Invitrogen). C: testigo, cepa hospedadora sin plásmido transformado. M: proteínas marcadoras (116, 66, 45, 35, 25, 18 y 14 kDa), ZGR, ZGT, GLO-1, GLO-2 u ZGY: lisil oxidasas sobreexpresadas. Las flechas indican la ubicación de la proteína sobreexpresada.

Figura 3: Desarrollo de viscosidad de una disolución de lactosuero al 12,5 % a 85 °C, con o sin tratamiento con lisil oxidasas ZGR, ZGT o GLO-1.

Figura 4. Perfiles de SDS-PAGE de  $\kappa$ -caseína,  $\alpha$ -caseína y una mezcla de  $\kappa$  y  $\alpha$ -caseína y los mismos perfiles tras la incubación con lisil oxidasa ZGR

Secuencias

SEQ\_ID NO 1: Proteína ZGR de *Aspergillus nidulans*

5 SEQ\_ID NO 2: Proteína ZGT de *Cryptococcus neoformans*

SEQ\_ID NO 3: Proteína GLO1 de *Fusarium graminearum*

SEQ\_ID NO 4: Proteína ZGY de *Podospora anserina*

SEQ\_ID NO 5: Proteína GLO2 de *Fusarium graminearum*

SEQ\_ID NO 6: ADN sintético de ZGR de *Aspergillus nidulans*

10 SEQ\_ID NO 7: ADN sintético de ZGT de *Cryptococcus neoformans*

SEQ\_ID NO 8: ADN genómico de GLO1 de *Fusarium graminearum*

SEQ\_ID NO 9: ADN sintético de ZGY de *Podospora anserina*

SEQ\_ID NO 10: ADN genómico de GLO2 de *Fusarium graminearum*

SEQ\_ID NO 11: motivo consenso: IHD[NS]LSGSMHDHV[IL]NFK

## 15 Ejemplos

Ejemplo 1

Identificación de genes que codifican para lisil oxidasa putativos en una secuencia genómica fúngica.

Las lisil oxidasas secretadas a partir de un origen fúngico son interesantes para producir en grandes cantidades dado que se utilizan en aplicaciones alimentarias. Actualmente, la única lisil oxidasa descrita secretada a partir de un hongo filamentoso es de *Aspergillus oryzae*, y se describe en SEQ\_ID NO: 2 de EP 1466979 A1. En la presente memoria hemos intentado sobreexpresar esta enzima de *Aspergillus oryzae* en el hongo *Aspergillus niger*. De forma sorprendente, no se logró medir ninguna actividad de lisil oxidasa en el fluido de cultivo tras la sobreexpresión de esta secuencia en *Aspergillus niger*. Para explicar este resultado sorprendente, examinamos la secuencia de aminoácidos descrita en EP 1466979 A1 con mayor detalle. De forma sorprendente, la secuencia de lisil oxidasa de *Aspergillus oryzae* putativa es diferente en algunos aspectos en posiciones importantes con respecto a la secuencia de otras lisil oxidasas y amina oxidasas de cobre. Es decir, la posición 164 de la proteína comentada del gen de *Aspergillus oryzae* descrita en SEQ\_ID NO: 2 de EP 1466979 A1 es una alanina, mientras que en todas las otras amina y lisil oxidasas descritas esta posición está altamente conservada como prolina. Además, la posición 78 en esta proteína comentada es una metionina, mientras que la leucina está altamente conservada en las amina oxidasas en esta posición. Además, la proteína descrita en EP 1 466 979 A1 contiene una inserción adicional de 2 aminoácidos tras el residuo 109 en comparación con la lisil oxidasa de mamífero y *Pichia*. Además la posición 499 en la proteína descrita en EP 1466979 A1 es una treonina, mientras que esta posición es siempre un residuo hidrófobo en otras amina oxidasas y residuo. Las posiciones conservadas en las proteínas con frecuencia se asocian con la función primaria de una enzima y no pueden cambiarse sin cambiar la actividad catalítica de la enzima. Por lo tanto, es dudoso que la secuencia proteica descrita en EP 1466979 A1 sea de hecho correcta y codifique para una lisil oxidasa funcional. La actividad de oxidasa que se ha medido en algunos de los transformantes en EP 1466979 A1, por lo tanto, podría no deberse a la sobreexpresión del gen descrito.

Dado que el abordaje de sobreexpresar el gen de EP 1466979 A1 no fue exitoso, examinamos cuidadosamente la secuencia de aminoácidos de lisil oxidasas y propusimos en la presente memoria un motivo de secuencia de aminoácidos que es útil para la identificación de lisil oxidasas de hongos. El motivo que proponemos como útil para identificar lisil oxidasas fúngicas genuinas es:

I-H-D-[NS]-L-S-G-S-M-H-D-H-V-[IL]-N-F-K (SEQ\_ID NO:11)

En este motivo cada aminoácido está representado con el código de una letra de IUPAC estándar y cuando más aminoácidos son posibles en una única posición, los posibles aminoácidos están entre paréntesis.

45 Hicimos una búsqueda en trEMBL (base de datos de ADN DNA traducido) con el motivo SEQ\_ID NO:11 con la opción de búsqueda de patrón en <http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/>. Este programa puede buscar en bases de datos de ADN traducido o proteína con un motivo definido tal como SEQ\_ID NO:11. Con este fin, el motivo se ingresa en el campo de búsqueda de patrón en el formato denominado Prosite, tal como se representó anteriormente, y se busca

5 en las bases de datos individuales para determinar la presencia del motivo en la secuencia proteica o en la secuencia de ADN traducida. Utilizando este método fuimos capaces de identificar 6 lisil oxidasas potenciales de origen fúngico a las que no se ha asignado esta actividad antes y todas contienen el motivo SEQ\_ID NO:11. Los genes que codifican para 4 de las 6 nuevas lisil oxidasas potenciales se mencionan en la Tabla 1, y se originan a partir de *Aspergillus nidulans*, *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium graminearum* y *Podospora anserina*. Además de estas 4 secuencias, también se puede encontrar un segundo gen de *Cryptococcus neoformans* (Q5KEB2\_CRYNE) y un gen de *Neurospora crassa* (Q7S286\_NEUCR) con el motivo SEQ\_ID NO:11. Las 6 secuencias son todas de hongos de especies separadas ampliamente de forma filogenética, pertenecen a los dos filas separados Basidiomycota y Ascomycota, lo cual sugiere que los motivos proteicos están altamente conservados en la evolución y codifican para residuos de aminoácidos relevantes de forma bioquímica. De forma interesante, todas las secuencias proteicas deducidas contienen una secuencia señal putativa en el extremo amínico de la proteína y, por lo tanto, podrían codificar para proteínas secretadas.

10 Para evaluar si los motivos de secuencia son de hecho útiles para la identificación de lisil oxidasas con actividad relevante, clonamos y sobreexpresamos los genes que codifican para las 4 proteínas nuevas mencionadas en la Tabla 1. Como testigo incluimos también un segundo gen de *Fusarium graminearum* con homología clara con respecto a las 4 lisil oxidasas distintas, pero que carece del motivo de secuencia de aminoácidos. Mediante el uso de este experimento con testigo podemos investigar si el uso del motivo es de hecho útil para la identificación y detección de nuevas lisil oxidasas relevantes de origen fúngico.

Tabla 1: Lista con propiedades de enzimas expresadas

Organismo donante	Nombre de plásmido	Proteína	Código	Motivo	Expresión	Acceso (trEMBL)
<i>Aspergillus nidulans</i>	pGBFINZGR-1	SEQ_ID NO 1	ZGR	+	+++	Q5B038_E MENI
<i>Cryptococcus neoformans</i>	pGBFINZGT-1	SEQ_ID NO 2	ZGT	+	+	Q55P44_C RYNE
<i>Fusarium graminearum</i>	pGBFINGLO-1	SEQ_ID NO 3	GLO1	+	+++	Q4HWI1_GI BZE
<i>Podospora anserina</i>	pGBFINZGY-1	SEQ_ID NO 4	ZGY	+	++	Q86ZN4_P ODAN
<i>Fusarium graminearum</i>	pGBFINGLO-2	SEQ_ID NO 5	GLO2	-	+++	Q4HWS1_G IBZE

20 Los genes sintéticos que pueden codificar para las proteínas descritas anteriormente se hicieron con DNA2.0 (<http://www.dnatwopointo.com/>). Es posible producir de forma sintética cualquier secuencia génica y usarla para clonación y expresión. Los genes sintéticos (SEQ\_ID NO:6, 7 y 9) se diseñaron utilizando un algoritmo que adapta la secuencia codificante al sesgo codónico para genes altamente expresados en *Aspergillus niger* (WO 06/077258). La excepción a esto fue la secuencia de los dos genes de *Fusarium* donde se tomó la secuencia de ADN genómico (SEQ\_ID NO:8 y 10). El secuencias génicas utilizadas codifican para las proteínas mencionadas en respectivamente SEQ\_ID NO: 1-5. Se introdujeron los sitios de clonación *PacI* y *Ascl* antes y después respectivamente de las secuencias codificantes de estas enzimas, a efectos de facilitar el procedimiento de clonación. Los fragmentos que contenían los genes de lisil oxidasas putativa sintética se digirieron con *PacI* y *Ascl*, y el fragmento de *PacI/Ascl* que comprendía las secuencias codificantes se aisló e intercambió por el fragmento *PacI/Ascl phyA* en pGBFIN-5 (WO 99/32617) utilizando métodos de biología molecular estándares. Los plásmidos de expresión resultantes se utilizaron para la expresión de los diferentes genes en *Aspergillus niger* y se denominaron tal como se describe en la Tabla 1. El procedimiento de clonación y la estructura de los plásmidos de expresión se representan en la Figura 1. En lugar del gen sintético Xxx cualquiera de los códigos de los genes mencionados en la Tabla 1 puede completarse, resultando en los plásmidos mencionados en la Tabla 1. La secuencia codificante de los genes de interés se clona después del promotor *glaA* de *Aspergillus niger*, y el gen *amdS* de *Aspergillus nidulans* está presente en los plásmidos de expresión como marcados para la selección en *Aspergillus niger*.

## Ejemplo 2

Transformación y sobreexpresión de lisil oxidasas fúngicas putativas mediante *A. niger*.

40 Los vectores de expresión pGBFINZGR-1, pGBFINZGT-1, pGBFINGLO-1, pGBFINZGY-1 y pGBFINGLO-2 se linearizaron mediante digestión con *NotI*, que elimina todas las secuencias derivadas de *E. coli* del vector de expresión. El ADN digerido se purificó utilizando extracción con fenol:cloroformo:isoamilalcohol (24:23:1) y precipitación con etanol. Estos vectores se utilizaron para transformar CBS513.88 de *Aspergillus niger*. Un procedimiento de transformación de *Aspergillus niger* se describe exhaustivamente en WO 98/46772. También se

describe cómo seleccionar los transformantes sobre placas de agar que contienen acetamida y seleccionar integrantes con múltiples copias objetivo. Preferiblemente, los transformantes de *A. niger* que contienen múltiples copias del casete de expresión se seleccionan para generación adicional de material de muestra. Para los vectores de expresión de lisil oxidasa se purificaron 30 transformantes de *A. niger* para cada plásmido transformado; primero colocando en placas los transformantes individuales sobre placas de medio selectivo y posteriormente colocándolos en placas con una colonia simple en placas de PDA. Las esporas de transformantes individuales se recogieron después de cultivo durante 1 semana a 30 grados Celsius. Las esporas se almacenaron refrigeradas y se utilizaron para la inoculación de medios líquidos.

Una cepa de *A. niger* que contenía múltiples copias del casete de expresión se utilizó para generación material de muestra mediante cultivo de la cepa en cultivos de matraz de agitación. Un método útil para el cultivo de cepas de *A. niger* y separación del micelio del caldo de cultivo se describe en WO 98/46772. El medio de cultivo fue CSM-MES (150 g de maltosa, 60 g de Soytone (Difco), 15 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 1 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 g de L-arginina, 80 mg de Tween-80, 20 g de MES pH6,2 por litro de medio). Se tomaron muestras de 5 ml en los días 4-8 de la fermentación, se centrifugaron durante 10 min a 5000 rpm en un Hereaus labofuge RF y los sobrenadantes se almacenaron a  $-20^\circ\text{C}$  hasta llevar a cabo análisis adicionales.

La Figura 2 muestra perfiles de expresión proteica, tales como se determinaron mediante SDS-PAGE (tinción con Coomassie) de los sobrenadantes tras el cultivo. De forma clara, las lisil oxidasas clonadas de *Aspergillus nidulans*, *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium graminearum* y *Podospora anserina* muestran una sobreexpresión excelente, lo cual demuestra que se expresan y excretan bien. Esto es muy sorprendente e inesperado dado que la enzima de *Aspergillus oryzae*, que está más estrechamente relacionada con el hospedador *Aspergillus niger*, no se pudo sobreexpresar aunque se informó anteriormente (EP1 466 979) que dicha lisil oxidasa de *Aspergillus oryzae* comentada podía expresarse en un hospedador heterólogo. Los cuatro genes de lisil oxidasa de los cuales todos los organismos donantes están menos relacionados con *Aspergillus niger* se expresaron de forma eficaz en este hospedador. Además, el gen GLO2 de *Fusarium graminearum* se expresó de forma eficaz y secretó a partir de *Aspergillus niger*.

### Ejemplo 3

Purificación de la lisil oxidasa sobreexpresada a partir del sobrenadante de *A. niger*.

Las lisil oxidasas derivadas de *Aspergillus nidulans*, *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium graminearum* y *Podospora anserina* que se sobreexpresaron en *Aspergillus niger* se cultivaron en grandes cantidades tal como se explica a continuación. Las cepas de *A. niger* transformadas que expresaban la lisil oxidasa relevantes se cultivaron en un medio de cultivo que contenía por litro maltosa.  $\text{H}_2\text{O}$ : 40 g; Soytone (Difco): 30 g;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ : 15 g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ : 1g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 1, L-arginina: 1 g, Tween-80: 0,08 g, Na-citrato: 70 g. Se ajustó el pH hasta 6,2. Luego de 5-6 días de cultivo a 30 grados C, las células se destruyeron mediante la adición de 3,5 g/l de benzoato de sodio y prolongación de la incubación durante 6 horas más. Luego se agregaron 10 g/l de  $\text{CaCl}_2$  y 45 g/l de auxiliar de filtración (Dicalite BF; Gent, Bélgica) al caldo. El micelio se extrajo mediante una filtración por tela inicial y posteriormente mediante filtración a través de filtros Z-2000 y Z-200 (Pall). La ultrafiltración se llevó a cabo utilizando una celda de ultrafiltración Amicon con una membrana de 10 kDa hasta una reducción en el volumen de 2-4 veces. La purificación de las lisil oxidasas se llevó a cabo de la siguiente forma:

#### Lisil oxidasa ZGR (derivada de *Aspergillus nidulans*)

El sobrenadante de cultivo concentrado que contenía la lisil oxidasa ZGR se equilibró en 20 mM de Tris.HCl (pH7,5; disolución amortiguadora A1) hasta una conductividad de 1,8 mS/cm en la celda de ultrafiltración Amicon. La muestra posteriormente se cargó en una columna de Q-Sepharose (5 ml Q-FF Hitrap, Pharmacia) utilizando un caudal de 5 ml/min. Después del lavado con 3 volúmenes de columna (cv) de disolución amortiguadora A1 la lisil oxidasa se eluyó utilizando un gradiente lineal de 20 cv de disolución amortiguadora A1 a B1 (B1 = disolución amortiguadora A1 + 1M NaCl). Las fracciones que contenían lisil oxidasa, que eluyeron con alrededor de 340 mM de NaCl, se identificaron a través de SDS-PAGE, se concentraron y se transfirieron a una celda de concentración Amicon con una membrana de 10 kDa para cambiar la disolución amortiguadora a 25 mM de Na-fosfato (pH6,6; disolución amortiguadora A2). La muestra posteriormente se aplicó en una columna de Q-Sepharose (5 ml Q-FF Hitrap, Pharmacia, 5 ml/min) equilibrada en disolución amortiguadora A2. Después del lavado con 3 cv de disolución amortiguadora A2 la lisil oxidasa se eluyó en gradiente lineal de 20 cv de disolución amortiguadora A2 a disolución amortiguadora B2 (B2 = disolución amortiguadora A2 + 1M NaCl). Las fracciones que contenían lisil oxidasa se concentraron. La enzima era al menos 95 % pura, tal como se determinó mediante SDS-PAGE (tinción con Coomassie).

#### Lisil oxidasa ZGT (derivada de *Cryptococcus neoformans*)

La lisil oxidasa ZGT se purificó esencialmente tal como se describió para ZGR con las siguientes adaptaciones: las soluciones amortiguadoras A1 y B1 estaban a pH7,1 en lugar de pH7,5. La lisil oxidasa se eluyó en la primera etapa

a 330 mM de NaCl, en la segunda columna eluyó a 470 mM de NaCl. La proteína era al menos 90 % pura, tal como se determinó mediante SDS-PAGE (tinción con Coomassie).

Lisil oxidasa GLO-1 (derivada de *Fusarium graminearum*).

5 La lisil oxidasa GLO-1 se purificó esencialmente tal como se describió para ZGR con las siguientes adaptaciones: las soluciones amortiguadoras A1 y B1 estaban a pH7,0 en lugar de pH7,5; la disolución amortiguadora A2 contenía 20 mM de Tris.HCl (pH7,7) y la disolución amortiguadora B2 contenía 20 mM de Tris.HCl (pH7,7) + 1 M NaCl. GLO-1 eluyó en la primera etapa de purificación a 90 mM de NaCl, en la segunda etapa de purificación no estaba unida a la columna y estaba presente en el flujo continuo. La proteína era al menos 95 % pura, tal como se determinó mediante SDS-PAGE (tinción con Coomassie).

10 Lisil oxidasa GLO-2 (derivada de *Fusarium graminearum*).

15 La lisil oxidasa GLO-2 se purificó esencialmente tal como se describió para ZGR con las siguientes adaptaciones: las soluciones amortiguadoras A1 y B1 estaban a pH7,0 en lugar de pH7,5; la disolución amortiguadora A2 contenía 20 mM de Tris.HCl (pH7,9) y la disolución amortiguadora B2 contenía 20 mM de Tris.HCl (pH7,9) + 1 M NaCl. GLO-2 eluyó en la primera etapa de purificación en dos picos a 80 y 200 mM respectivamente, indicado algo de heterogeneidad proteica. Esto no se examinó adicionalmente. Ambos picos se concentraron y se utilizaron en la segunda etapa de purificación, en la que la enzima eluyó nuevamente en dos fracciones a 180 y 400 mM respectivamente, eluyéndose la mayor parte de la proteína (~80 %) a 180 mM. Esta fracción se concentró y se utilizó para análisis adicionales.

Lisil oxidasa ZGY (derivada de *Podospora anserina*)

20 La lisil oxidasa ZGY se purificó esencialmente tal como se describió para ZGR con las siguientes adaptaciones: La disolución amortiguadora A1 contenía 50 mM de Na-acetato (pH5,0) y la disolución amortiguadora B1 contenía 50 mM de Na-acetato (pH5,0) + 1M NaCl. En la segunda etapa de purificación se utilizó una columna de hidroxiapatita (XK16/20, 30 ml, Pharmacia, 2 ml/min). La disolución amortiguadora A2 contenía 10 mM de Na-fosfato (pH6,8) y la disolución amortiguadora B2 contenía 500 mM de Na-fosfato (pH6,8). La proteína era al menos 95 % pura, tal como se determinó mediante SDS-PAGE (tinción con Coomassie).

25 Las concentraciones de proteína se determinaron utilizando el reactivo Bradford.

#### Ejemplo 4

Determinación de actividad de las lisil oxidasas.

30 La actividad enzimática de la lisil oxidasa en un sustrato de amina resulta en la formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y NH<sub>3</sub>. Ambos productos de reacción pueden utilizarse para monitorizar la actividad enzimática.

Monitorización de la actividad de lisil oxidasa por formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

35 La actividad de lisil oxidasa se monitorizó utilizando un kit de ensayo de amina-oxidasas Amplex Red Mono comercializado por Invitrogen. Las reacciones se llevaron a cabo según las instrucciones del fabricante. La concentración del sustrato en la disolución de ensayo fue 1 mM, a menos que se indique lo contrario. Las reacciones se llevaron a cabo a 30°C, a menos que se indique lo contrario, y la reacción se siguió en el tiempo utilizando un lector de placa de microtitulación Genios (TECAN). Para la determinación del pH óptimo de la enzima se utilizaron las siguientes soluciones amortiguadoras: 25 mM de Na-citrato (pH3,0, pH6,0), 25 mM de Na-acetato (pH4,0, pH5,0), 25 mM de Tris.HCl (pH7,0, pH8,0) y Tris.Glycine (pH9,0, pH10,0).

Monitorización de la actividad de lisil oxidasa por formación de NH<sub>3</sub>.

40 La actividad de lisil oxidasa se determinó incubando la enzima (100 microgramos de enzima por ml de disolución de ensayo) durante 4 horas a 37°C con agitación suave (500 rpm) en tubos Eppendorff abiertos en una disolución que contenía 10 mM de Ac-Gly-Lys-OMe (obtenido de Bachem, Alemania) y 25 mM de disolución amortiguadora de Na-fosfato (pH 7,0) La formación de NH<sub>3</sub> detectó mediante tiras de prueba de amoníaco (obtenida de Hach, Alemania). En un experimento en blanco se agregó agua en lugar de la disolución enzimática. La formación de un color verde oscuro indica la presencia de NH<sub>3</sub>; la ausencia de amoníaco deja un color amarillo.

45 Las lisil oxidasas ZGR, ZGT, GLO-1, GLO-2 y ZGY se sometieron a prueba para determinar la actividad de lisil oxidasa en el ensayo Amplex Red utilizando los siguientes sustratos (10,0 mM en disolución de ensayo): Ac-Gly-Lys-OMe, Ac-Lys-OMe (ambos obtenidos de Bachem, Alemania), bencilamina y p-tiramina (Invitrogen). En el caso de los sustratos que contienen lisina, el único grupo amino libres es el de la cadena lateral de lisina dado que el grupo alfa-amino está bloqueado. Cualquier actividad de estos sustratos, por lo tanto, indica de forma inequívoca actividad de lisil oxidasa. Los resultados se presentan a continuación, la actividad se presenta como el % de la actividad obtenido

con el sustrato que exhibió la actividad máxima. Los datos para la enzima de *Pichia* se calcularon a partir de los valores  $k_{cat}/K_m$  publicados Kuchar & Dooley (J Inorg Biochem (2001) 83, 193-204)

Código de enzima	Ac-Gly-Lys-OMe	Ac-Lys-OMe	p-Tiramina	Bencilamina
ZGR	182	157	122	100
ZGT	208	162	174	100
GLO-1	204	167	96	100
GLO-2	32	87	213	100
ZGY	385	262	239	100
<i>Pichia pastoris</i>	95	No determinado	No determinado	100

Tabla 1: Actividad de lisil oxidasa en diversos sustratos. La actividad de la enzima en bencilamina se fija a 100 %; las otras actividades se expresan como % de esta actividad.

5 Todas las enzimas muestran una preferencia clara por Ac-Gly-Lys-OMe tal como se espera de una lisil oxidasa. Está claro que ZGR, ZGT, GLO-1 y ZGY tienen una preferencia sorprendentemente alta por el grupo lisil y la actividad es más alta cuando el sustrato peptídico es más grande (Ac-Gly-Lys-OMe vs Ac-Lys-OMe). De forma sorprendente, esta preferencia por sustratos de lisina es incluso más fuerte que la de la lisil oxidasa de *Pichia*. Donde la lisil oxidasa derivada de *Pichia* es incluso un poco más activa en la bencil amina en comparación con Ac-Gly-Lys-OMe, ZGR, ZGT, GLO-1 y ZGY tienen una preferencia clara por el sustrato de lisil. Además, la proteína GLO-2 tiene una clara preferencia, como la enzima de *Pichia*, por sustratos pequeños como bencilamina y tiramina. De forma sorprendente, las cuatro lisil oxidasas que se identificaron utilizando el motivo de secuencia de aminoácidos tuvieron una preferencia mayor por los sustratos de lisina y las lisil oxidasas que carecen de los motivos tienen un espectro de actividad preferida menor. Aparentemente la búsqueda con los motivos de aminoácidos identifica específicamente las lisil oxidasas con más actividad preferida en sustratos de lisina y es, por lo tanto, una nueva herramienta importante para la identificación de lisil oxidasas útiles. Cabe señalar que las lisil oxidasas que se encuentran utilizando el motivo SEQ\_ID NO:11 son solo 40-60 % idénticas entre sí utilizando BLASTP, pero aparentemente todas tienen en común que la especificidad de estas enzimas se inclina más hacia una preferencia mayor por sustratos de lisina. Las enzimas con puntajes de homología similares utilizando BLASTP pero que carecen del motivo SEQ\_ID NO:11, como GLO2 pero también las lisil oxidasas de *Pichia pastoris* y *Aspergillus oryzae*, no muestran esta especificidad de sustrato.

Las enzimas ZGR, ZGT y GLO-1 también se evaluaron para determinar la liberación de amoníaco, utilizando Ac-Gly-Lys-OMe como sustrato. En todos los casos la liberación de amoníaco se demostró de forma inequívoca. Estos resultados confirman adicionalmente que las enzimas identificadas son lisil oxidasas.

25 Ejemplo 5

Actividad de lisil oxidasas en diversos sustratos proteicos.

30 Las lisil oxidasas ZGR, ZGT y GLO-1 se evaluaron para determinar la actividad a pH6 en los siguientes sustratos proteicos: lactosuero (BiPro de Davisco), caseína (obtenida de DMV, Países Bajos;), hidrolizado de gluten (gluten vital (obtenido de Protinax) se hidrolizó con Fromase 750TL (obtenido de DSM, Países Bajos) durante 1 hora a 55°C, pH4,1. La enzima se inactivó mediante tratamiento térmico a 85°C, 15 minutos y se secó por pulverización). A los efectos de preferencia, Ac-Gly-Lys-OMe se utilizó en las condiciones descritas anteriormente. Los resultados se proporcionan a continuación. La actividad de diversas lisil oxidasas se califica en forma ++++ (muy activa, comparable con Ac-Gly-Lys-OMe), +++ (activa) ++ (moderadamente activa), + poco activa, - no activa.

Enzima	Lactosuero	Caseína	Gluten	Ac-Gly-Lys-OMe
ZGR	+	++++	++++	++++
ZGT	+	++++	++	++++

Enzima	Lactosuero	Caseína	Gluten	Ac-Gly-Lys-OMe
GLO-1	-	+/-	+	++++
GLO-2	-	-	-	+

Tabla 2: Actividad de ZGR, ZGT y GLO-1 en las proteínas lactosuero, caseína y gluten.

De forma clara, las lisil oxidasas difieren en su actividad entre sí y también en su actividad con respecto a diversas proteínas. Las proteínas de lactosuero son más difíciles de modificar mediante las lisil oxidasas, mientras que la caseína es el sustrato más accesible para ZGR y ZGT. ZGR también es muy activa en gluten, mientras que ZGT es solo moderadamente activa. GLO-1 es la menos activa de las tres lisil oxidasas, no mostrando actividad detectable en proteínas de lactosuero, casi nada de actividad en caseína y poca actividad en proteína de gluten. Sin embargo, los resultados muestran de forma clara que las enzimas son activas en los residuos de lisina en proteínas, tal como se espera de lisil oxidasas. Tal como se esperaba en función de los resultados del ejemplo 4, GLO-2 no exhibió actividad en ninguno de los sustratos proteicos.

10 Ejemplo 6

Determinación de pH y perfiles T de las lisil oxidasas.

Los perfiles de pH de las lisil oxidasas se determinaron en un rango de pH 3-8, utilizando soluciones amortiguadoras tales como se indicaron en el ejemplo 4. El ensayo se llevó a cabo en dos etapas. Primero la reacción se llevó a cabo al pH adecuado durante un período de tiempo fijo. Luego la disolución se diluyó en la disolución amortiguadora estándar para el ensayo Amplex Red (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y se determinó la tasa inicial. El registro del perfil de pH se llevó a cabo 30°C utilizando bencilamina como sustrato. Los resultados se proporcionan en la Tabla 3.

Enzima	pH óptimo	rango de pH con >80 % de actividad máxima	T óptima (°C)
ZGR	4,0	3,5-7,0	30
ZGT	5,0	4,5-5,5	<20
GLO-1	6,0	5,5-6,5	50
ZGY	9,0	8,0-10,0	40

Tabla 3. pH óptimo y rango de pH en el que las lisil oxidasas exhiben >80 % de actividad máxima

La tabla muestra que las lisil oxidasas tienen diferentes pH óptimos, que varían de pH4 a pH9. La lisil oxidasa con el rango de pH más amplio es ZGR (3,5 unidades de pH). La temperatura óptima de estas enzimas se determinó a su pH óptimo y se proporcionan en la tabla 3. La enzima GLO-1 muestra la T óptima más alta (50°C). ZGR, ZGT y ZGY tienen una T óptima relativamente baja, pero en rangos de temperatura compatibles con muchas aplicaciones alimentarias. La T óptima de ZGT es notablemente baja, incluso por debajo de 20°C.

Ejemplo 7

Demostración de una estructura de quinona en lisil oxidasas.

Se sabe que las lisil oxidasas contienen una estructura de quinona en su sitio activo. Por lo tanto, verificamos la presencia de dicho cofactor en las lisil oxidasas identificadas utilizando el siguiente procedimiento. Las lisil oxidasas ZGR, ZGT y GLO-1 se aplicaron en un SDS-PAGE (10% bis-Tris NuPage, Invitrogen) y posteriormente se sometieron a transferencia Western sobre papel de nitrocelulosa. Las quinonas se visualizaron mediante tinción de la transferencia con NBT (cloruro de azul de nitro-tetrazolio) (0,24 mM en 2M Na-glicinato, pH10). La presencia de una estructura de quinona resulta en la aparición de color púrpura en el lugar donde está ubicada la proteína. ZGR, ZGT y GLO-1 mostraron de forma clara la formación de este color púrpura. Como testigo, se incluyó una endoproteasa (Maxiren600, obtenida de DSM, Países Bajos) y una carboxi-peptidasa (Accelerzyme CPG, obtenida de DSM, Países Bajos). Se sabe que estas enzimas carecen de un grupo quinona y no exhibieron un color púrpura tras la tinción con NBT. Este experimento muestra que las lisil oxidasas ZGR, ZGT y GLO-1 contienen una estructura de quinona, tal como se espera de las lisil oxidasas. La naturaleza exacta de la quinona no se puede derivar a partir de este experimento.

Ejemplo 8

Uso de las lisil oxidasas para modificar la textura de soluciones de lactosuero concentradas tras calentamiento.

En la primera etapa del proceso, se disolvió WPI (BiPro, Davisco) en agua MilliQ hasta 10,5 % y se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente con ZGR, ZGT o GLO-1 (10 mg de enzima / 25 ml de disolución). El tratamiento con la lisil oxidasa no resultó en ningún cambio significativo en la viscosidad de la disolución proteica, lo cual indica ausencia o niveles bajos (<1 %) de reticulación proteica. En un experimento testigo, se agregó agua en lugar de la disolución enzimática. A continuación las soluciones se transfirieron a una celda de medición de un Rapid Visco Analyzer (RVA-4 NewPort Scientific, Australia), equilibrada a 85°C. En esta segunda etapa del proceso, los intermediarios reactivos, formados durante la primera etapa del proceso de dejaron hacer reacción bajo la formación de enlaces covalentes. La disolución se agitó lentamente (50 rpm) y a continuación se produjo el cambio en la viscosidad. La Figura 5 muestra de forma clara que en el blanco, no se produce cambio de viscosidad lo cual indica que no hay formación de gel. En cambio, la adición de las lisil oxidasas resulta en un aumento considerable en la viscosidad. Esto es especialmente pronunciado para ZGR. La formación de gel se produce como resultado del tratamiento con la lisil oxidasa, lo que evidencia la reactividad de los sustratos proteicos reactivos preparados en la primera etapa del proceso. De forma sorprendente, incluso GLO-1 tuvo efecto aunque en el ejemplo 4 no se observó actividad de esta lisil oxidasa en la proteína de lactosuero. La reacción en el ejemplo 4 se monitorizó durante solo unos pocos minutos, mientras que en el presente ejemplo la enzima se dejó hacer reacción con la proteína durante toda la noche. La enzima aparentemente tiene baja actividad en proteínas de lactosuero, pero todavía suficiente para afectar el desarrollo de la viscosidad tras el calentamiento, tal como se demostró en este ejemplo. Está claro que las lisil oxidasas son capaces de generar intermediarios de proteína reactiva que pueden utilizarse en una segunda etapa mediante calentamiento para modificar la textura de soluciones de lactosuero concentradas. Las proteínas de lactosuero están presentes como agentes texturizantes en muchos alimentos; es de interés industrial ser capaz de modificar las propiedades de texturización de las proteínas de lactosuero con lisil oxidasa, y es de especial interés ser capaz de preparar intermediarios reactivos que posteriormente pueden utilizarse para modificar la textura de los alimentos.

#### Ejemplo 9

Uso de la lisil oxidasa ZGR para mejorar el volumen de pan de arroz.

Se mezclaron 480 gramos de harina de arroz (BL-250, van Sillevoldt, Países Bajos) y 20 gramos de proteína de arroz (Remy Industries, 0400061) en una mezcladora Hobart (primera velocidad: 2 minutos, segunda velocidad: 3 minutos) con 475 gramos de agua, 22,5 gramos de Koningsgist (Gilde, Países Bajos), 10 gramos de NaCl, 5 gramos de sacarosa, 50 gramos de biskien (grasa, UniPro, Países Bajos), 20 gramos de goma xantano y 12 ppm de Bakezyme P500 (DSM, Países Bajos). Las masas se moldearon a mano, primera prueba durante 20 minutos a 38°C, prueba final durante 40 minutos a 38°C (ambas a 85 % de humedad relativa). Se agregó lisil oxidasa ZGR (100 ppm) antes de la mezcla en un experimento, en el experimento testigo no se agregó lisil oxidasa. La masa con lisil oxidasa se consideró como más desarrollada. Los panes se hornearon (240°C, 20 minutos) utilizando un horno MIWE Combo (Arnstein, Alemania, válvula cerrada). Tras hornear, el pan que contenía la lisil oxidasa tenía una estructura más estable y un volumen mayor.

#### Ejemplo 10

Reticulación de proteínas lácteas.

Se prepararon soluciones al 3 % (p/v) en agua de  $\kappa$ -caseína,  $\alpha$ -caseína y una mezcla de  $\kappa$  y  $\alpha$ -caseína (ambas al 0,3 % p/v) y se incubaron durante toda la noche a 37°C con la lisil oxidasa ZGR (0,1 mg/ml). Posteriormente, las muestras se calentaron a 85°C (30 minutos). Se prepararon muestras testigo en las que no se agregó la lisil oxidasa ZGR. Las muestras se analizaron en SDS-PAGE (véase la Figura 4). De forma clara, la adición de la lisil oxidasa resulta en la formación de proteínas con peso molecular aumentado, en comparación con el testigo en el que no se agregó lisil oxidasa. El tratamiento con la lisil oxidasa ZGR conduce a retículos proteicos covalentes, que conducen a aglomerados de peso molecular más alto.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> DSM IP Assets B.V.

<120> NUEVAS LISIL OXIDASAS

<130> 25977WO

5 <160> 11

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 817

<212> PRT

10 <213> ZGR de Aspergillus nidulans

<400> 1

```

Met Lys Leu Pro Leu Ser Phe Ser Gly Gly Ile Ala Leu Leu Leu Ile
1           5           10           15

Gly Ser Leu Ala Gly Asp Val Val Ala Thr Lys Leu Asp Pro Ser Arg
          20           25           30

Asp Leu Val Arg Gln Lys Ser Arg Gly Arg Lys Asn Gln Met Arg Ser
          35           40           45

Leu Val Gly Arg Ser Asn Gln His Ile Thr His Gln Ser Arg Pro Tyr
          50           55           60

Thr Asn Glu Tyr Ala Ser Pro Cys Gln Ile Thr Pro Pro Gln Glu Ile
65           70           75           80

Lys Ala Pro Lys Glu Asn Val Trp Tyr Gly Leu Thr Asp Asp Glu Thr
          85           90           95

Ala Asp Val Ala Lys Trp Leu Phe Gly Arg Pro Glu Leu Asn Leu Thr
          100          105          110

Thr Thr Glu Asn Ala Gly Glu Trp Asp Asn Thr Ile Ala Leu Ile Glu
          115          120          125

Leu His Arg Pro Asn Lys Ser Glu Ala Ile Pro Tyr Leu Asp Gly Ser
          130          135          140

Gly Pro Ala Pro Thr Arg His Ala His Val Arg Leu Asn Asn Arg Ala
145          150          155          160
    
```

# ES 2 608 033 T3

Thr Thr Asp Pro Tyr Phe Ala Asp Ile Leu Val Gly Pro Leu Pro Val  
 165 170 175

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

Thr Gln Gly Gln Val Arg Asn Val Glu Pro Asp Gly Glu Thr Val Tyr  
 195 200 205

Ser Glu Trp Leu Phe Lys Ile Ser Ala Ser Ile Ala Asp Ile Thr Leu  
 210 215 220

Asp Leu Trp Asn Gly Thr Ala Leu Gly Leu Glu Asn Asp Thr Leu Asp  
 225 230 235 240

Ile Trp Gly Ile Asp Pro Leu Trp Gln Asp Asp Gly Arg Ile Ile Arg  
 245 250 255

Trp Asp Met Phe Trp Asn Met Ala Asp Asp Glu Phe Asp Ser Glu Thr  
 260 265 270

Leu Leu Pro Leu Gly Leu Tyr Leu Lys Ser Asp Val Thr Gly Arg Asp  
 275 280 285

Pro Ser Gln Trp Lys Leu Leu Gly Trp Met Tyr Asn Asp Ile Phe Tyr  
 290 295 300

Glu Thr Thr Glu Glu Phe Arg Lys Ala Tyr Trp Ser Pro Gly Phe Val  
 305 310 315 320

Lys Leu Lys Pro Asn Val Asp Gly Ala Trp Ala His Thr Glu Gln Arg  
 325 330 335

Gly Pro Val Pro Pro Gln Asp Arg Lys Gln Pro Pro Val Met Ile Ala  
 340 345 350

Pro Asp Gly Ala Arg Tyr Ser Val Asp Ala Glu Arg Lys Tyr Val Thr  
 355 360 365

Trp Met Asp Phe Ser Phe Tyr Ile Ala Phe Asn Arg Asp Thr Gly Leu  
 370 375 380

ES 2 608 033 T3

Ser Leu Phe Asp Ile Lys Tyr Lys Gly Gln Arg Val Leu Tyr Glu Leu  
385 390 395 400

Gly Leu Gln Glu Ala Leu Ala His Tyr Ala Ala Asn Asp Pro Val Gln  
405 410 415

Ser Ser Val Ala Tyr Leu Asp Ser Tyr Tyr Gly Phe Gly Pro Tyr Ala  
420 425 430

Phe Glu Leu Leu Lys Gly Tyr Asp Cys Pro Ser Tyr Ala Ser Tyr Leu  
435 440 445

Asn Thr Ser Phe Tyr Lys Asp Glu Glu Thr His Thr His Val Asp Ser  
450 455 460

Leu Cys Leu Phe Glu Phe Asp Ala Asp Tyr Pro Met Ala Arg His Ser  
465 470 475 480

Thr Ser Glu Phe Val Ser Val Thr Lys Asn Val Tyr Phe Thr Leu Arg  
485 490 495

Ser Val Ser Thr Ile Gly Asn Tyr Asp Tyr Met Phe Ser Tyr Asn Phe  
500 505 510

His Met Asp Gly Thr Ile Gly Val Glu Val Arg Ala Ser Gly Tyr Ile  
515 520 525

Gln Ser Ala Tyr Tyr Ala Asn Asn Gln Asp Phe Gly Tyr Gln Ile His  
530 535 540

Asp Ser Leu Ser Gly Ser Met His Asp His Val Leu Asn Phe Lys Ala  
545 550 555 560

Asp Phe Asp Ile Leu Gly Pro Asn Asn Thr Ile Glu Leu Val Ser Val  
565 570 575

Val Pro Val Thr Lys Gln Phe Ser Trp Ser Gly Asn Lys Thr Arg Asn  
580 585 590

Thr Met Gln Leu Gly Arg Ser Phe Ile His Ser Glu Asp Glu Ala Arg  
595 600 605

ES 2 608 033 T3

Leu Asn Trp Gly Phe Asn Gly Gln Thr Gln Leu His Val Val Asn Gln  
610 615 620

Asp Lys Pro Asn Lys Phe Gly Glu Pro Arg Gly Tyr Arg Ile Leu Pro  
625 630 635 640

Ser Ala Gly Thr Ala His Leu Thr Val Leu Asn Ser Ser Asn Leu Val  
645 650 655

His Ala Ala His Trp Ala Glu Tyr Asp Val Gln Val Thr Arg Gln His  
660 665 670

Asp Phe Glu Pro Thr Ser Ala His Pro Tyr Asn Ser Gln Asp Ile His  
675 680 685

Asn Pro Pro Val Asp Phe Ser Thr Phe Phe Asn Gly Glu Ser Leu Asn  
690 695 700

Gln Thr Asp Leu Val Val Trp Leu Asn Leu Gly Met His His Val Pro  
705 710 715 720

His Thr Gly Asp Leu Pro Asn Thr Val Phe Thr Thr Ala His Ser Gly  
725 730 735

Val Ala Phe Thr Pro Leu Asn Tyr Leu Pro Gly Asp Pro Ser Arg Glu  
740 745 750

Thr Val Asn Met Val Arg Val Asp Tyr Ser Asp Gly Ala Ala Thr Ala  
755 760 765

Val Arg Thr Phe Gly Gln Ser Asn Glu Thr Cys Ser Val Val Leu Gln  
770 775 780

Pro Val Glu Asn Glu Leu Trp Ser Tyr Gln Gly Asp Val Val Val Arg  
785 790 795 800

Lys Phe Pro Tyr Asp Pro Asn Asp Pro Phe Tyr Glu Thr Asp Ser Asp  
805 810 815

Ala

<210> 2

< 211> 801

< 212> PRT

5 < 213>ZGT de *Cryptococcus neoformans*

<400> 2

# ES 2 608 033 T3

Met Arg Ala Ile Ala Leu Leu Tyr Leu Leu Gly Thr Ala Phe Ala Val  
 1 5 10 15  
 Pro Ser Pro Lys Ile Ser Asn Val Lys Lys Pro Gly His Tyr His His  
 20 25 30  
 Pro His Arg Arg Asp Ile Val Thr Asn Glu Val Asp Ala Ser Ala Ser  
 35 40 45  
 Ser Pro Thr Thr Ser Ala Pro Lys Asp Asn Ile Trp Asn Phe Leu Ser  
 50 55 60  
 Asn Asp Glu Ala Ala Gly Ile Ile Ala Phe Leu His Ser Gln Thr Glu  
 65 70 75 80  
 Leu Asn Leu Thr Ala Val Asn Asp Ala Gly Asp Trp Asp Asn Thr Ile  
 85 90 95  
 Thr Val Val Asp Leu Leu Pro Pro Asn Lys Thr Glu Ala Leu Ser Tyr  
 100 105 110  
 Met Asp Gly Asn Gly Thr Lys Pro Glu Arg Trp Gly Ile Ala Ser Leu  
 115 120 125  
 Leu Cys Gly Ala Thr Glu Glu Pro Tyr Ala Gln Asp Leu Val Val Gly  
 130 135 140  
 Pro Leu Pro Val Ser Glu Val Thr Ile Tyr Tyr Pro Tyr Thr Tyr Gly  
 145 150 155 160  
 Thr His Ala Pro Asp Ala Lys Ile Arg Val Tyr Asp Met Asp Asp Asn  
 165 170 175  
 Ser Glu Phe Leu Ser Asp Ile Ala Met Ser Met Lys Asp Ile Ile Ser  
 180 185 190  
 Asp Ile Leu Asn Ala Thr Ile Asp Thr Ala Asp Asp Leu Ala Asp Thr  
 195 200 205

# ES 2 608 033 T3

Phe Asp Ile Trp Gly Ile Asp Pro Leu Trp His Gln Pro Asp Glu Asn  
 210 215 220

Gly Asn Asp Arg Val Ile Tyr Trp Ala Gly Phe Trp Arg Tyr Pro Asp  
 225 230 235 240

Ser Leu Gln Met Glu Asn Ser Trp Ile Asn Phe Asp Gly Glu Thr Leu  
 245 250 255

Leu Pro Gln Gly Leu Tyr Ile Gln Thr Asp Ile Thr Gly Arg Asp Arg  
 260 265 270

Ser Lys Trp Ala Leu Met Gly Ile Leu Tyr Gly Asp Asp Tyr Tyr Thr  
 275 280 285

Ser Val Asp Glu Phe Arg Ala Ala Trp Arg Lys Pro Gly Phe Lys Lys  
 290 295 300

Phe Thr Pro Asn Tyr Ser Gly Asp Trp Ile Gly Thr Asp Gln Thr Gly  
 305 310 315 320

Asp Val Met Pro Phe Glu Thr Glu Ala Pro Pro Met Asn Val Gln Pro  
 325 330 335

Gly Gly Gln Arg Phe Lys Val Asp Glu Asp Asn Lys Tyr Val Glu Trp  
 340 345 350

Met Asp Phe Ser Phe Tyr Leu Trp Phe Thr Arg Asp Thr Gly Met Arg  
 355 360 365

Leu Tyr Asp Val Lys Phe Lys Gly Glu Arg Ile Ile Tyr Glu Leu Gly  
 370 375 380

Leu Gln Glu Ala Ile Ala His Tyr Ala Gly Asn Asp Pro Val Gln Ser  
 385 390 395 400

Gly Thr Ala Tyr Leu Asp Thr Tyr Tyr Gly Phe Gly Pro Tyr Ala Phe  
 405 410 415

Ser Gln Val Pro Gly Phe Asp Met Pro Leu Tyr Ala Tyr Cys Met Asn  
 420 425 430

# ES 2 608 033 T3

Thr Ser Phe His Ala Ala Glu Leu Ser Thr Ser His Arg Cys Gly Ile  
 435 440 445

Ser Ile Phe Glu Ala Asp Gln Asn Tyr Pro Ile Gln Arg His Ser Asn  
 450 455 460

Met Asn Tyr Val Ser Ala Thr Lys Asn Ile Ala Leu Thr Leu Arg Ser  
 465 470 475 480

Ile Ser Thr Val Gly Asn Tyr Asp Tyr Asn Phe Asp Tyr Asn Phe Tyr  
 485 490 495

Leu Asp Gly Thr Ile Glu Thr Val Val Arg Ala Ser Gly Tyr Ile Gln  
 500 505 510

Ser Ala Phe Tyr Ala Asn Asn Thr Glu Tyr Gly Tyr Gln Ile His Asp  
 515 520 525

Ser Leu Ser Gly Ser Met His Asp His Val Leu Asn Phe Lys Val Asp  
 530 535 540

Phe Asp Ile Ala Gly Val Glu Asn Thr Leu Val Lys His Ile Val Glu  
 545 550 555 560

Pro Lys Glu Ile Lys Tyr Lys Trp Asn Asn Leu Thr Arg Ser Thr Met  
 565 570 575

His Leu Val Arg Lys Glu Ile Thr Asn Glu Asp Glu Gly Lys Met Asn  
 580 585 590

Trp Ser His Asn Gly Gln Glu Gln Val Val Ile Val Asn Lys Asp Ala  
 595 600 605

Pro Asn Lys Tyr Gly Glu Pro Lys Gly Tyr Lys Ile Met Pro Ser Arg  
 610 615 620

Gly Gly Ser Gly Met His Leu Thr Ile Thr Asn Ser Ser Asn Leu Phe  
 625 630 635 640

Asn Ser Gln Gly Phe Ala Thr His Gln Tyr Tyr Val Leu Lys Arg Lys  
 645 650 655

Asp Ser Glu Leu Arg Ala Ser Asn Ala Trp Asn Asp Tyr Asp Thr Gln

ES 2 608 033 T3

660 665 670

His Pro Met Ile Asp Phe Ser Lys Tyr Phe Asp Gly Glu Asp Ile Glu  
675 680 685

Gln Glu Asp Ile Val Met Tyr Phe Asn Leu Gly Met His His Val Pro  
690 695 700

His Thr Gly Asp Leu Pro Asn Thr Val Phe Ser Thr Ala Gln Ser Gly  
705 710 715 720

Met Met Ile Leu Pro His Asn Tyr Leu Leu Ser Asp Pro Ser Arg Gln  
725 730 735

Ala Thr Gln Gln Ile Arg Ile Asp Tyr Asn Val Asn Ser Thr Thr Asp  
740 745 750

Val Tyr Ser Trp Ala Ser Gln Ala Ala Thr Gly Glu Leu Asp Phe Ser  
755 760 765

Gln Ile Thr Trp Asp Pro Tyr Thr Tyr Asp Gly Asp Val Ser Val Arg  
770 775 780

Lys Phe Pro Tyr Asp Pro Gln Asn Pro Phe Asn Asn Thr Glu Ser Ile  
785 790 795 800

Val

<210> 3

<211> 797

<212> PRT

5 <213> GLO1 de *Fusarium graminearum*

<400> 3

Met Gly Lys Glu Lys Thr Glu Leu Thr Met Arg Leu Ile Val Cys Leu  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Ser Leu Ile Phe Asp Arg Arg Val Leu Ala Arg Ser Thr  
20 25 30

Ser Asp Gly Pro Ala Ala Arg Tyr Asn Ser Leu Asn Arg His Lys Val  
35 40 45

ES 2 608 033 T3

Glu Thr Ser Gln Cys Asp Ser Asn Lys Glu Val Gly Val Lys Ala Pro  
 50 55 60  
 Trp Lys Asn Val Phe Gln Ser Leu Thr Asp Gln Glu Tyr Ala Asp Val  
 65 70 75 80  
 Thr Ala Tyr Leu His Lys Gln Glu Glu Leu Asn Leu Thr Ala Ile Val  
 85 90 95  
 Asn Ser Thr Ser Trp Asp Asn Val Ile Val Ser Met Asp Leu Leu Gln  
 100 105 110  
 Pro Asn Lys Thr Asp Ala Leu Thr Tyr Leu Glu Gly Asn Gly Pro Ala  
 115 120 125  
 Pro Ala Arg Tyr Ala Arg Ala Thr Leu Gln Phe Asn Ser Gln Leu Gln  
 130 135 140  
 Pro Tyr Ile Gln Glu Tyr Met Val Gly Pro Leu Pro Val Gln Glu Gly  
 145 150 155 160  
 Ser Thr Arg Tyr Glu Glu Leu Asn Tyr Met Phe Ser Ser Gly Arg Gly  
 165 170 175  
 Arg Ile Asn Val Tyr Asn Ala Asp Thr Glu Ala Ile Ala Glu Phe Asn  
 180 185 190  
 Leu Ala Val Gly Thr Glu Ile Gln Asn Ile Thr Lys Gln Leu Leu Asn  
 195 200 205  
 Gly Thr Ala Thr Gly Ala Lys Asp Asp Ser Leu Leu Ile Ala Gly Ser  
 210 215 220  
 Asp Pro Leu Ile His Asn Asp Asp Arg Val Tyr Gln Trp Asn Glu Phe  
 225 230 235 240  
 Tyr Thr Ala His Thr Gly Gln Phe Phe Ser Glu Thr Ile Leu Pro Thr  
 245 250 255  
 Ser Leu Gln Phe Lys Val Asp Ile Thr Gly Arg Asp Pro Ser Lys Trp  
 260 265 270

# ES 2 608 033 T3

Lys Val Val Gly Trp Tyr Tyr Asp Gly Ser Tyr Trp Ser Thr Thr Ala  
 275 280 285

Glu Phe Lys Glu Gly Ser Lys Thr Leu Lys Arg Lys Pro Gly Pro Asn  
 290 295 300

Val Asp Gly Leu Trp Thr Ser Thr Asp Gln Gln Gly Asp Lys Leu Pro  
 305 310 315 320

Leu Asp His Leu Gln Pro Pro Thr Ala Val Gln Pro Asp Gly Pro Arg  
 325 330 335

Phe Arg Val Asp Arg Glu Glu Asn Tyr Ile Glu Trp Met Asp Phe Ser  
 340 345 350

Phe Phe Ile Ser Asn His Lys Glu Thr Gly Leu Gln Leu His Asp Val  
 355 360 365

Arg Tyr Arg Gly Glu Arg Ile Ile Tyr Glu Leu Gly Leu Gln Glu Ala  
 370 375 380

Met Ala His Tyr Ala Ser Cln Asp Pro Leu His Ala Ser Ser Ala Tyr  
 385 390 395 400

Leu Asp Thr Ser Tyr Gly Ile Gly Thr Ser Cln Trp Asn Leu Val Asp  
 405 410 415

Gly Phe Asp Cys Pro Ser His Ser Thr Tyr Leu Asn Thr Ser Phe Tyr  
 420 425 430

Ile Ser Glu Met Thr His Ile His Pro Asn Ser Leu Cys Leu Phe Glu  
 435 440 445

His Asp Thr Gly Tyr Pro Ile Gln Arg His Leu Thr Gly Thr Tyr Val  
 450 455 460

Ser Ala Thr Lys Asn Ile Val Phe Thr Val Arg Ser Val Ser Thr Val  
 465 470 475 480

Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Phe Glu Tyr Thr Phe His Tyr Asp Gly Ser  
 485 490 495

Ile Ser Val Thr Val Arg Ala Ser Gly Tyr Ile Gln Gly Ala Phe Trp

# ES 2 608 033 T3

500	505	510
Ser Gly Asp Gly Asp Tyr Gly Phe His Ile His Asp Asn Leu Ser Gly 515 520 525		
Ser Met His Asp His Val Ile Asn Phe Lys Leu Asp Leu Asp Ile Lys 530 535 540		
Gly Arg Lys Asn Ser Val Leu Lys Thr Glu Phe Val Pro Val Ser Val 545 550 555 560		
Val Tyr Pro Trp Ser Glu Gly Gln Ser Ile Asn Thr Met Lys Ala Asn 565 570 575		
Arg Ser Tyr Ile Ala Ser Glu Asp Glu Gly Lys Ile Thr Trp Ala Lys 580 585 590		
Asn Gly Ala Ala Ala Tyr Ala Val Val Asn Lys Asp Ala Leu Asn Asp 595 600 605		
Phe Gly Glu Ala Pro Gly Tyr Ala Ile Ser Pro Asn Ser Gly Ser Thr 610 615 620		
Gly His Leu Thr Val Gln Ser Ser Thr Ala Leu Gly Gln Ser Ala Asn 625 630 635 640		
Trp Ala Asn His Asn Ile Phe Ala Leu Gln Gln His Asp Thr Glu Pro 645 650 655		
Lys Ser Ala Tyr Ala Phe Asn Ser Tyr Asp Pro His His Pro Ala Val 660 665 670		
Asp Phe Asn Lys Phe Phe Asn Gly Glu Ser Leu Asp Gln Glu Asp Ile 675 680 685		
Val Leu Tyr Phe Asn Leu Gly Met His His Leu Pro Asn Thr Ala Asp 690 695 700		
Leu Pro Asn Thr Val Thr Thr Lys Ala Val Ser Ser Met Met Ile Ser 705 710 715 720		
Pro Gln Asn Tyr Phe Ser Gly Asp Ile Ser Arg Arg Thr Met His Gln 725 730 735		

# ES 2 608 033 T3

Val Arg Val Ser Phe Asp Asp Lys Ser Asn Val Thr Ala Val Asn Met  
 740 745 750

Phe Gly Thr Lys Gln Pro Thr Cys Ala Phe Asp Met Ala Lys Ala Ala  
 755 760 765

Pro Lys Leu Asp Thr Phe Val Gly Glu Leu Gln Ile Pro Lys Phe Pro  
 770 775 780

Phe Asn Pro Ser Gly Ser Leu Gln Thr Asn Pro Gly Gly  
 785 790 795

<210> 4

< 211> 821

< 212> PRT

5 < 213> ZGY de Podospora anserina

<400> 4

Met Gly Phe Phe Asp Ser Leu Ser Pro Arg Ala Val Ala Thr Ser Ala  
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Thr Ser Phe Ala Gln Asp Ala Leu Ala Arg Pro Asn Pro  
 20 25 30

Asp Pro Lys Ala Pro Trp Val Lys Asn Thr Gly Leu Gly Lys Lys Lys  
 35 40 45

Met Ala Asn His Leu Lys Arg Ala Ile Met Gly Asp Arg Arg Ala Val  
 50 55 60

Glu Thr Pro Phe Cys Ser Glu Thr Leu Ala Thr Glu Ile Lys Ala Pro  
 65 70 75 80

Lys Pro Asn Val Trp Gly Pro Leu Val Asp Val Glu Val Ala Ser Val  
 85 90 95

Val Glu Trp Leu Phe Ala Gln Ala Asp Leu Asn Leu Thr Val Thr Glu  
 100 105 110

Glu Ala Gly Gly Trp Asp Asn Thr Ile Gln Leu Val Glu Ala Met Trp  
 115 120 125

# ES 2 608 033 T3

Pro Asn Lys Thr Asp Val Leu Ala Phe Val Asp Gly Asp Gly Pro Ala  
 130 135 140

Pro Thr Lys Tyr Ala His Val Val Leu Asn Asn Arg Ala Thr Glu Thr  
 145 150 155 160

Pro His Tyr Ala Asp Ile Ile Val Gly Pro Leu Pro Leu Asp Asn Ala  
 165 170 175

Thr Ala Lys Trp Glu Pro Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Lys Gln Asn Gly  
 180 185 190

Gly Lys Val Arg Asn Leu Asp Ala Asp Ser Asp Arg Leu Tyr Ser Glu  
 195 200 205

Trp Leu Phe Lys Ile Gly Ala Ser Val Ala Asp Ile Thr Leu Asp Leu  
 210 215 220

Trp Asn Gly Thr Ala Met Gly Leu Glu Asn Asp Thr Leu Ser Ile Trp  
 225 230 235 240

Gly Ile Asp Pro Leu Trp Gln Asp Asp Gly Glu Ile Ile Arg Trp Asp  
 245 250 255

Thr Phe Trp Asn Ile Pro Thr Gly Asp Phe Asp Asp Met Thr Leu Phe  
 260 265 270

Pro Leu Gly Leu Tyr Phe Ser Ser Glu Val Ser Gly Arg Asp Pro Ser  
 275 280 285

Lys Trp Glu Leu Arg Gly Trp Leu Tyr Asn Ser Val Phe Tyr Ala Thr  
 290 295 300

Thr Glu Glu Phe Arg Ala Ala Tyr Trp Ser Glu Asp Phe Val Lys Asn  
 305 310 315 320

Gly Pro Asn Val Asp Gly Asp Trp Ala Arg Thr Asp Lys Asn Gly Glu  
 325 330 335

Thr Pro Glu Met Asp Lys Ala Gln Gly Pro Val Ile Val Ala Pro Ala  
 340 345 350

Gly Ala Arg Phe Ala Val Asp His Lys Glu Lys Tyr Val Glu Trp Met



ES 2 608 033 T3

Ala Leu Glu Arg Lys Phe Ile Glu Thr Glu Asp Glu Ser Arg Phe Asn  
595 600 605

Trp Gly Pro Asn Ser Ala Thr Gln Val Leu Ile Val Asn Glu Asn Glu  
610 615 620

Arg Asn Lys His Gly Glu Met Arg Gly Tyr Arg Val Leu Pro Tyr Met  
625 630 635 640

Gly Thr Ala His Leu Thr Val Gln Asn Ser Thr Asn Leu Gly Val Ala  
645 650 655

Ala Gln Trp Ala Asn His Asp Val Gln Ile Thr Lys Tyr Lys Asp Ser  
660 665 670

Glu Gln Lys Ala Tyr His Ala Phe Asn Thr Gln Asp Val His Asp Pro  
675 680 685

Pro Val Asn Phe Asp Lys Tyr Phe Asp Gly Glu Ser Val Arg Asn Glu  
690 695 700

Asp Ile Val Leu Trp Leu Asn Leu Gly Met His His Val Pro His Thr  
705 710 715 720

Gly Asp Leu Pro Asn Thr Val Gln Thr Thr Ala His Ser Gly Ile Gln  
725 730 735

Phe Met Pro Ser Asn Tyr Phe Asp Ile Asp Gln Ser Arg Arg Thr Val  
740 745 750

Asn Gln Val Arg Ile Asn Tyr Phe Asn Gly Ser Ala Glu Val Glu Glu  
755 760 765

Phe Gly Gln Phe Lys Val Gly Ser Ser Glu Gly Thr Cys Ser Thr Cys  
770 775 780

Lys Leu Asn Tyr Thr Pro Leu Glu Pro Glu His Gln Gly Tyr Lys Gly  
785 790 795 800

Asp Val Val Ile Arg Lys Phe Pro Phe Asp Pro Asn Asn Pro Phe Tyr  
805 810 815

Ala Thr Ser Gly Ile  
820

<210> 5

5 < 211> 770

< 212> PRT

< 213> GLO2 de Fusarium graminearum

<400> 5

# ES 2 608 033 T3

Met Arg Pro Ser Gly Leu Leu Val Ser Leu Ser Leu Val Pro Leu Ala  
 1 5 10 15  
 Leu Ala Arg Ala Phe Pro Pro Ala Arg Leu Glu Ser Arg Lys Glu Asp  
 20 25 30  
 Ser Cys Ser Ser Val Gln Pro Ser Ala Ser Ala Pro His Lys Asn Phe  
 35 40 45  
 Trp Gly Ser Leu Thr Lys Lys Glu Thr Ala Asp Val Leu Ala Phe Leu  
 50 55 60  
 His Arg Asp Thr Thr Gly Phe Asn Leu Thr Val Ala Glu Asn Ala Thr  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Asp Asn Lys Ile Met Ser Val Glu Leu Met Met Pro Asn Lys  
 85 90 95  
 Ser Asp Thr Leu Pro Phe Leu Ser Asp Lys Ala Gly Ser Pro Thr Arg  
 100 105 110  
 Tyr Ala Leu Ala Ala Val Met Phe Gly Val Pro Glu Lys Ala Tyr Leu  
 115 120 125  
 Gln Glu Phe Lys Val Gly Pro Leu Pro Ile Thr Asn Ala Ser Ser Val  
 130 135 140  
 Thr Pro Phe Thr Phe Ala Asn Thr Lys Lys Gly Asp Gly Lys Ile Ala  
 145 150 155 160  
 Val Val Asn Pro Asp Ala Glu Asp Tyr Gly Asn Phe Asn Leu Lys Ile  
 165 170 175  
 Met Lys Glu Ala Glu Asp Val Thr Lys Leu Leu Trp Asn Leu Thr Val

# ES 2 608 033 T3

180	185	190
Asp Asp Gly Leu Gln Ile Pro Leu Ala Phe Ala Ala Pro Ile Asn Val 195 200 205		
Thr Asp Gly Lys Val Ile Met Trp Gln Gly Phe Asn Ala Pro Val Thr 210 215 220		
Ser Ile Tyr Asp Thr Ile Ser Leu Leu Pro Leu Gly Leu Tyr Leu Arg 225 230 235 240		
Thr Asp Ile Thr Gly Arg Asp Pro Ser Gln Trp Lys Val Thr Gly Trp 245 250 255		
Val Tyr Gly Asn Glu Phe Tyr Lys Asp Leu Asp Gly Leu Arg Ala Ala 260 265 270		
Val Ala Lys Pro Asp Phe Lys Pro Leu Gly Met Asn Leu Asp Gln Pro 275 280 285		
Trp Ala His Thr Asn Lys His Gly Asp Asp Leu Pro Leu Asp Asp Glu 290 295 300		
Ala Pro Pro Ala Asn Val Gln Ser Gly Lys Ser Arg Phe Ala Val Asp 305 310 315 320		
Glu Asp Glu Ser Tyr Val Thr Trp Met Asp Phe Ser Phe Tyr Thr Ser 325 330 335		
Ile Thr Arg Asp Asn Gly Leu Arg Leu Tyr Asp Val Lys Tyr Lys Gly 340 345 350		
Lys Arg Ile Leu Tyr Glu Leu Gly Leu Asp Glu Ala Ile Ala His Tyr 355 360 365		
Ala Gly Ile Asp Pro Val Gln Ser Gly Ile Cys Tyr Phe Asp Ser Met 370 375 380		
Ser Gly Phe Gly Pro Ala Met Ile Ser Leu Val Lys Gly Tyr Asp Cys 385 390 395 400		
Pro Ala Tyr Ser His Tyr Ser Asn Val Thr Gln Thr Thr Gly Glu Thr 405 410 415		

# ES 2 608 033 T3

Thr Phe Thr Gln Lys Asp Ala Leu Cys Met Phe Glu Ile Asp Lys Gly  
 420 425 430

Phe Pro Ile Gln Arg His Ser Trp Ala Gly His Thr Thr Val Thr Lys  
 435 440 445

Asn Ile Ala Phe Asn Ile Arg Ala Ile Tyr Thr Ile Gly Asn Tyr Asp  
 450 455 460

Tyr Met Met Thr Tyr Gln Phe His Leu Asp Gly Ser Ile Glu Ile Asp  
 465 470 475 480

Val Arg Ala Ser Gly Tyr Ile Ser Ser Ala Phe Tyr Ala Glu Asn Glu  
 485 490 495

Asp Tyr Gly Phe Lys Ile His Asp Ser Leu Ser Gly Ser Leu His Asp  
 500 505 510

His Val Ile Thr Phe Lys Ala Asp Phe Asp Ile Leu Gly Glu Lys Asn  
 515 520 525

Ser Leu Gln Lys Ile Asp Ile Lys Pro Ser Thr Glu Lys Tyr Lys Trp  
 530 535 540

Ser Asp Gln Thr Arg Asn Thr Met Lys Ala Val Lys Ser Phe Ile Asp  
 545 550 555 560

Asn Glu Asp Asp Ala Lys Ile Asn Trp Ser Pro Asn Gly Ala Thr Met  
 565 570 575

Tyr Ala Val Val Asn Lys Asp Glu Lys Asn Pro Tyr Gly Glu Ser Pro  
 580 585 590

Gly Tyr Arg Val Ala Pro Ala Ser Gly Val Ala Tyr Leu Thr Val Gln  
 595 600 605

Asp Ser Ser Val Met Gln Asn Ala Gly His His Thr Thr His His Leu  
 610 615 620

Tyr Ala Thr Arg Gln Lys Asp Asn Glu Leu Tyr Ala Val Gly Ala Tyr  
 625 630 635 640



# ES 2 608 033 T3

agcggaggcca tcccttactt ggaaggcagc ggtcccgccg ccaccctca cgcaccagtt 480  
 cgtctcaaca acccgccac caccgatccc tacttcgccc acattctcgc gggccccctg 540  
 cccgtctcca acgctactac ttgggagcct ctggaattcc cttaactcgc taagactcag 600  
 ggtcaggctcc gcaaccctga acccgaccga gagaccgtct actcggagtg gcttttcaag 660  
 atctctgccc ctatccggga catcaccctg gacctttgga accgtaaccg ccttggctcg 720  
 gagaaccaca ctctcgacat ctggggaatc gatcccttgt ggcaggatga cggaccatc 780  
 attcgcctggg acatgctctg gaacatggcc gatgaccagt tcgactccga gacctgctg 840  
 cctctcggcc tcaccctcaa gtccgaccgc actggcccgc atccctagcca gtggaagttg 900  
 ctgggttggg tctacaacga cttttctac gagactactg aggaattccg taaggctac 960  
 tggcccccg gttctgtaa gctgaagccc aacgttgacg gcgctgggc ccacaccgag 1020  
 cagccgggtc ccgtgcccc ccaggaccgt aagcagcccc ccgtcatgat cgcctcagc 1080  
 ggcgctcgtt acctctcga cgcgagcgt aagtaagta cctggatgga tttctcttc 1140  
 tacatcgtt tcaaccgga taccgctctg cccctcttcg acatcaagta caagggtcag 1200  
 cgtgtgctct accaactcgg tcttcaggag gctctggccc actacgctgc caaccgatcc 1260  
 gtccagctcc ccgttcgcta cctcgattcc taataaggt tcggccccta cgccttcag 1320  
 cttctcaagg gctaccactg cccctcgtac gcgtccatcc tcaacacttc cttctacaag 1380  
 gacgaagaga cccacaccca cgttgactct ctctgcctgt tcgagctga tgcggattac 1440  
 cctatggccc gccacagcac ctccgagttc gtcagcgtca ccaagaacgc ctacttcacc 1500  
 ctgcctagcg ttcgaccat cggaaactac gactacatgt tctccataa cttccacatg 1560  
 gacgctaata ttggcctga ggtcccgccc cctggctaca tccagagcgc ctactacgcc 1620  
 aacaaccagg acctcggcta ccagatccac gattccctgt cgggtccat gcacgaccac 1680  
 gtcttgaact tcaaggctga cttcgacatc cttggctcta acaacactat tgagctcgtc 1740  
 tccgtcgttc ccgtcaccaa gcagttctcc cggtcgggta acaagaccgc caacaccatg 1800  
 cagctgggac gttcttccat ccactccgag gatgaggccc gcctcaactg gggtttcaac 1860  
 ggcagacccc agctccacgt cgtgaaccag gacaagccc acaagttcgg cagacctcgt 1920  
 ggttaccgca tccctccctc cgcggtaac gctcaactga ccgttctgaa ctccagcaac 1980  
 cttgtccag ctgcccactg ggcggagtac gacgtgcagg ttaccgcca gcacgatttc 2040  
 gagcctactt ccgctcacc ctacaactct caggatatac acaaccccc cgtcgacttc 2100  
 tccaactct tcaaccgtga atccctgac cagactgacc tcgtcgtctg gctgaacctc 2160

## ES 2 608 033 T3

ggatgcacc acgttctca caccggagac ttgcccaca ctgtctcac cacgctcac 2220  
agcggcgtcg ccttcacccc tcttaactac ctccccggtg acccctctcg tgagaccgtc 2280  
aacatggtgc gtgtcgacta ctgggatggc gccgccaccg ccgttcgcac ctccggccag 2340  
tccaacgaaa cttgcagcgt tgtgctgeag cccgtcgaga acgagctctg gtcttaccag 2400  
ggtgatgtcg tcgtccgtaa gttcccttac gaccccaacg atcccttota cgagaccgac 2460  
tccgacgctt aaaggcgcgc c 2481

<210> 7

< 211> 2433

< 212> ADN

5 < 213> ADN sintético de ZGT de *Cryptococcus neoformans*

<400> 7

## ES 2 608 033 T3

ttaattaaca cagtcaaaat ggcgctatt gccctcctt acttgetggg caccgccttc	60
gctgttccta gccctaagat ttcgaacgtg aagaagccc gccactacca ccacccccac	120
cgtcgtgaca tcgtcactaa cgaggtcgat gcgtccgctt cctctccac cacttcggcc	180
cccaggata acatctggaa cttcctctcc aacgatgaag cggctggaat tatcgcttc	240
ctccactctc agaccgagct gaacctcact gccgtgaacg accctggaga ttgggacaac	300
accattaccg ttgtcgacct gctccccct aacaagaccg aagcccttc ttacatggac	360
ggcaacggaa ctaagccga gcgctggggc atcgctctc tccttcggg tgcaccgag	420
gagccctacg ctcaggattt ggtggtggga cctctgctg ttagcaggc taccatctac	480
taccctaca cttacggtac ccaagctccc gacgccaaga tcgctgtga cgacatggac	540
gataactcgg aattccttag cgatctgcc atgagcatga aggacatcat ctccgatatc	600
ctgaacgcta ccattgacac tgccgacgac ctgcgcgaca ccttcgacat ttggggatt	660
gacccccctc ggcaccagcc tgaagagaac ggtaacgac gtgtcatctc ctgggctggt	720
ttctggcgtt accctgattc cctgcagatg gagaactcca ctatcaact cgacggcgag	780
accctctcc cccagggtt gtacatccag actgacatca ccggtcgcga ccgttccaag	840
tgggcgctca tgggtatcct gtacggtgat gactactaca cctccgtgga cgaattccgc	900
gctgcctggc gtaagcccg tttcaagaag tcactccc actacagcgg cgattggatc	960
ggcaaccgac agaccggtga tgteatgcc ttcgagaccg aagccctcc tatgaacgtc	1020
cagcccggcg gccagcgtt caaggtcgac gaagacaaca agtacgttga gtggatggac	1080
ttcagcttct acctgacct caccgcgac accggaatgc gtcttacga cgtcaagttc	1140

## ES 2 608 033 T3

aagggtgago gtatcatcta cgagttggga cttcaggagg ccacgctca ctacgcccgt 1200  
aacgaccccg tocagttctgg cactggctac ctggatacct actacggctc cggcccctac 1260  
gctttctccc aggtccctgg ttctgacatg cccctctacg cctactgcat gaacacttgg 1320  
ttcacgctg ccgagctctc tacctcccac cgtgcgga tctccatttc cgaggccgat 1380  
cagaactacc ccattccagc ccactogaac atgaactacg tctctgccc taagaacatc 1440  
gctctgactc tgcgctccat ctccaccgtt ggtaactacg attacaactc cgactacaac 1500  
ttctactctg acggtaccat tgagaccgtc gtcctgctc cgggttaca tcagtccgct 1560  
ttctacgcta acaacacga gtacggctac cagatccacg actccctcag cggttccatg 1620  
cacgatcag ttttgaactt caaggttgat ctgatatcg cgggtgtcga gaacaccctg 1680  
gtcaagcaca tggttgaacc taaggaaatc aagtacaagt ggaacaacct caccctgagc 1740  
accatgcacc tgggtgcgca gaggatcacc aacgaggacg agggcaagat gaactggctc 1800  
cacaacggac aggagcaggt cgtgatcgtc aacaaggacg cccctaaca gtacggtgag 1860  
cccagggtt acaagattat gccctctcgc ggtggttctg gtatgcaact gaccataact 1920  
aacagctcca acctcttcaa ctgcgagggc ctgctacc caccgacta cgtccttaag 1980  
cgttaaggact ctgaactcgc tgcgtccaac gcttggaaac actacgatac tcagcaccoc 2040  
atgattgact tcagcaagta cttegcaggt gaggatctg agcaggaaga catcgttatg 2100  
tacttcaacc tggcgtgca ccacgttccc cacaccgggtg acctcccaca caccgtgttc 2160  
tccaccgccc agtccggaat gatgatcctt cctcacaact acctgctgag cgaaccctct 2220  
cgcacggcca ctacagcat ccgtattgat tacaacgtca actccaccac cgacgtttac 2280  
tctggggcct cgcaggctgc cactggcgag ctgatttct ctgagatcac ctgggacct 2340  
tacaacctac atggtgacgt cagcgtctgc aagttccct acgacctca gaacccttc 2400  
aacaacaccg agtccatcgt ctaaaggcgc gcc 2433

<210> 8

< 211> 2762

< 212> ADN

5 < 213> ADN genómico de GLO1 de *Fusarium graminearum*

<400> 8

ttaattaacc catagccatc atgagattaa tegtctgctt acaagctgc tgccttatat 60  
ttgataggag agctttggct cgttctacct ccgatggctc agcagcaagg tacaattcct 120  
tgaacgctca caaagtcgaa acgtcacaat gtgattccaa caaggaagt gggtcaagg 180

# ES 2 608 033 T3

ccccatggaa aaatgtttcc cagagocctga cagatcaaga gtatgctgat gttactgcat	240
atcttcacaa gcaggaagaa ctcaacctga ccgctattgt gaactcgaca tcgtgagtct	300
tgaacttttt actttctcca tccactgat tttttgaaa atcctctgct ctgctgtcta	360
cctttgcaca tcaacaagtc ttggtgact ctataaagtt gggataatgc catcgtgtct	420
atggacttgt tgcagccaaa caagactgat gccttgacat atctogaagg taatgggcca	480
gctccagctc gatatgcgcg ggccacgctg caattcaact cgcaactgca accatacatt	540
caagagtaca tggttggccc attaactggt caggaagggc cactcggata cgaagagctc	600
aattacatgt tctcactcgc acgtggctgc attaacgtgt acaacgctga tactgaggcc	660
attgctgagt tcaaccttgc tgttggaaag gaaatacaga acataaccaa gcagcttctc	720
aatggcgtaa gtaaccgatg tccggatcgc ttttcgatgc tccatgctaa tgaagccaac	780
agactgctac aggtgctaaa gacgacagtc ctctaatcgc aggcagtgat cctctgatcc	840
acaacgatga cagggctctat cagtggaaag agttctacac tgcctacaag ggtcaattct	900
tttcagagac gatcctcctc accagtcctc agttcaaagt cgatatcacc ggtcagatcc	960
cttccaaatg gaaggtggtc ggttggattt acgacggcag ctattggctg acgaccgcgc	1020
agtttaaaga gggatctaag acgctcaaga gaaagccagg gcccaacgtc gatgggcttt	1080
ggacctcac tgaccagcaa ggtgacaagt taccgcttga ccacctgcaa cccctactg	1140
ctgttcaacc cgatggctca cgaattcgtg tggatagaga ggagaattac attgagtgga	1200
gtaagtgcac attgtaatgt tttgaatcac gctttagtty acaaccgatc agtggacttt	1260
agctttttca tctcaaacca caaagagact ggtctgcaac tccatgatgc cagatataga	1320
ggcgagcgta tcatctatga gcttggcctc caggaagcga tggctcatta cgttcccg	1380
gatccgctgc atgcctcgtc agcatatctg gacacttcat acggcattgg caccagccag	1440
tggaaccttg tcgacggett tgattgtctt tctcactcca cctacctcaa cacatctttt	1500
tacatcagcg agatgactca cctccacccc aacagcttgt gtctttctga acatgatact	1560
ggatatccta tacagcgaca tttgacaggg acgtatgttt ccgcgaccaa gaacattgta	1620
tttactgttc gcagcgtctc tacagttggc aactatgact atttgttoga gtataccttt	1680
cattacgacg ggtccattag cgtcactggt agagcgtctg gctatatcca gggagcgttt	1740
tggtcggag atggcgatta tggctttcat atccatgata acctgtcagg ttctatgcat	1800
gacctgtca ttaactttaa gctcagctc gatatcaaag gcaggaagaa tagtgtgtta	1860

## ES 2 608 033 T3

aagactgagt ttgtgccgct ctcagtagtg tacgttgttt tccatccatt ataactacat 1920  
gtactaactt gaacagatac cccgggtctg agggacaatc aatcaatact atgaaggcca 1980  
accggctgta tatcgccagt gaggacgagg gcaagattac atgggcgaag aatggagcag 2040  
ctgcataatgc agttgtcaac aaggatgctc tgaatgattt cggagaggca cccggctacg 2100  
cgattttctc aagtaagtat cccctacatg gatacaaacc tggacgacac taaccggctt 2160  
cgcagacagc ggtagcacag ggcaactgac ggtgcagtc tctacagctc ttggacagtc 2220  
cgaaaactgg gccaatcaca acattttctc cctgcagcaa caccgacacc agccgaaaag 2280  
cgattacgct ttcaatagtt atgatccgca ccaccagct gtagacttca ataaattctt 2340  
caatggggag agtctcgatc aagaagacat cgttttgtaa gtaaccotta ctgagcatta 2400  
ctattaccgc agactaacag ttacgcaaga tacttcaacc tcggcatgca ccacctacct 2460  
aatacggctg atctgccaa cactgtgacg acgaaagccg tttcgcgat gatgatttca 2520  
cctcagaatt acttttcagg cgatatctca cgacggacca tgcataagc gcgtgtctcc 2580  
ttgatgaca agtcaaatgt cactgctgtc aacatgtttg gaacgaagca gctacttgc 2640  
ggttttgata tggccaaggc cgcaccaag ctggatacct tegtgggga gcttcagatt 2700  
cctaaatttc ctttcaacc aagcggagct cttcagacaa accccggctg ttaaggcgcg 2760  
cc 2762

<210> 9

<211> 2493

<212> ADN

### 5 <213> ADN sintético de ZGY de *Podospira anserina*

<400> 9

ttaattaaca ccgtcaaaat gggcttcttc gactctctgt cccctcgcgc gggggctact 60  
tcggctctcc ttttgacctc cttcgcccag gacgctctcg cgggtcccaa ccccgatcct 120  
aaggccccct gggtaagaa caccggctctg ggaaagaaga agatggccaa ccaccttaag 180  
cggccatca tgggtgaccg tcggctgttt gaaaccccc tctgcagcga aactttggcc 240  
accgagatca agcccccaa gccaacggtt tgggtcctc tcgtcgatgc cgaggctcct 300  
tcggtgtcgc aatggctctt cggccaggct gatctgaacc tgaccgtgac tgaggagct 360  
ggaggctggg ataacaccat ccagcttctc gagctatgt ggctaaca gaccgatgct 420  
ctgcctctcg tggacggtga cggaccgcg cccactaagt acgctcacg tctctcaac 480  
aacctgcta ccgagactcc ccactacgcc gacattatcg tgggtcccc ccccttggac 540

ES 2 608 033 T3

aacgccactg ccaagtggga gccctctgag tacccttaca ctaagcagaa cggtaggcaag 600  
 gttcccaacc tegacgctga ctccgatcgt ctgtacagcg agtggctgtc caagattgga 660  
 gccctctgctg ccgacatcac ccttgacctc tggaaaggta ccgccatggg cctcgagaac 720  
 gacaccctgt ccatttgggg catcgacct ctctggcagg atgacggcga gattatcctg 780  
 tgggatacct tcgggaacat cccctaccggg gatttccagc acatgaacct gttccccttg 840  
 ggctctact tctcgccga agtctctggg cgtgacctc ccaagtggga gcttcgccc 900  
 tggctgtaca acagcctctt ctacgcgacc accgaggagt tccgcctgc ctactggagc 960  
 gaagattctg tgaagaacgg tcccacgctc gatggtagct gggctcgcac tgacaagaac 1020  
 ggtgagacc cggaaatgga caaggcccag ggccctgtta ttgctcctcc tgcggagct 1080  
 cgttctcctg tccatccaaa ggaaaagtac gttgaatgga tggatggctc gttctacgctc 1140  
 ggcttcaacc gcgacaccgg tcccggcctc ctccgatctc gtacaaggg tgagcgtttg 1200  
 gtctacgagc ttctctccca ggaggccctg ggcactacg ccggcaacga cctatgaac 1260  
 tccgctaccg cctaccggga cagctctac ggtttcggcc cctacaactc cgagctcgtt 1320  
 aaggcttacg actgcccgc ctacgccacc tacatgaaca cctcctctca cgtgaacgag 1380  
 gaaaccggca ctccatccga ttccctctgc ctcttcgagt acgtcctga ctaccctatg 1440  
 cagcgcacaa ccacctctga ttaactgagc gtcaccaaga aacttactc cgtcatcctg 1500  
 tccatcctca ccatcggcaa ctacgactac cagcagagct tctctctctc catggaacgtt 1560  
 tcttcgcccg tccagctctg ccctccgga tacattcagt ccgcttactc ccgcccgaac 1620  
 gaggactacg gcttcaagat ccacgataac cttagcggat cgtgcacga ccacgtcctg 1680  
 aacttcaagg ccgactccga cgtgttgggc accaacaact ccattgagct tatgtctatg 1740  
 gtcctcctct cccgctccta cccctggctc gctggtaagg tccgtaaac catggccctg 1800  
 gagcgcaggt tccatcgagc tgaagatgag tccgcttcca actggggctc taactccgct 1860  
 acccaggttc tccatcctaa ccgagaacgag cgtacaacgc accgcccgaac gcgcccctac 1920  
 cgtgtgctcc ctccatcggg caccgcccac ctgactgtcc agaacagcac caacttgggt 1980  
 gtcgctcgcg agtggcccaa ccacgacgct cagatccca agtacaagga ttccgagcag 2040  
 aaggcttacc accgcttcaa cactcaggac gtccacgac cccccttaa ctccgacaag 2100  
 tacttcgagc gagaatctgt ccgcaacgag gatattgtcc tctggctgaa ccttgggatg 2160  
 caccacgtgc ctccacccg tgacctccc aacctgttc agaccaccgc ccacagccgc 2220  
 atccagttca tgcctccaa ctacttcgac atcgatcagt ccgcccgtac cgtcaaccag 2280  
 gtgcgtatta actacttcaa ccgctccgct gaggtccagg aattccgaca gttcaaggtc 2340  
 ggtagctctg agggcaccct ctccactcgc aagctgaact acaccctctc ccgaccgag 2400  
 caccaggggtt accaaggcga cgttctcctc ccgaagttcc cctccgacc taacaacccc 2460  
 ttctacgcca cctccggtat ctaaggccgc gcc 2493

# ES 2 608 033 T3

<211> 2965

<212> ADN

<213> ADN genómico de GLO2 de *Fusarium graminearum*

<400> 10

ttaattaact	cataggcacc	atgcgtccct	caggtctcct	ggtctcgctt	tcgctgggtc	60
ctctggctct	agccagagct	tttctcccg	caaggttggc	aagtcgcaag	gaggactctt	120
gttcgtcggc	ccagcgcctt	gcgagtgctc	ctcacaagaa	cttctggggc	tcctcgacca	180
agaaagagac	tgctgatggt	ctcgcatttt	tcgctcgcga	tacaacaggt	ttcaatctga	240
ccgttgccga	gaatgctact	aggattttat	tggatctctat	gtgatcttga	aaccactaac	300
agttcattat	agtcgcgata	acaagatgtg	agtcttgtac	tatgaacct	gattttaacc	360
tcaactcaca	aggttttagc	atgtccgctg	agctcatgat	gcccaacaag	agcgatactc	420
tcccattctt	gtcagacaaa	gcgggtagcc	caacaagata	cgccttagct	gcggtcatgt	480
ttggcgtaac	tgaaaaggct	tatctccagg	aattcaaagt	tggccgcttg	cccatcacta	540
atgcataaag	tgttacacct	tttacttttg	caaatacgaa	gaagggcgac	ggtaaagatc	600
cagtcgtcaa	ccctgacgca	gaggattatg	gcaacttcaa	ccctcaagatc	atgaaggagg	660
cagaggatgt	gaccaagctt	ctcgggaatt	cggtgagtta	tgtgtcttga	attccatggt	720
tctttatcta	acatattcaa	gacggtcgat	gatggactcc	aaatcccgct	agcctttgca	780
gccctatcca	atgtcacoga	tggaaaaggc	atcatgtggc	aaggcttcaa	cgcgccagtt	840
accagcatct	acgacacaat	ctcactgctt	ccactgggtc	tgtatttgcc	aacagacacc	900
accggccgcg	atcctagtca	atggaaagtc	actggttggg	tatacggtaa	tgaattctac	960
aaggatctcg	atggtttgcg	tcgagctgct	gccaaagccg	atctcaaac	ccggggaatg	1020
aacttggaac	agccttgggc	ccacacaaac	aaacacggcg	atgatctgcc	ccgggacgat	1080
gaagctccac	cagccaatgt	tcaatccgga	aagtcgagat	ttgctgttga	tgaagatgag	1140
agctatgtga	cttgaggtga	gtagcttctg	atcttgacta	actgtccaac	tttactaatt	1200
cgatacgtca	gtggactttt	cttctacac	tagcattact	cagacaatg	gactacgact	1260

5

## ES 2 608 033 T3

gtatgatgtt aagtacaagg gcaagaggat tctctacgag gtatgcatga atcgcaaaat 1320  
 gactacgtct taaactaaca tttctagctt gggctggaog aggcgattgc acattatgog 1380  
 taagttgtga aagtacacctg gccctacgoc actgttattg acaccatttg cagcggatc 1440  
 gatcctgtac aatccggaat ttgttatctc gacagcatgt ctggactogg acccgcaatg 1500  
 atctctctcg tgaaggtaa gaactaaaaa cgactcgaga attgtttat cacattgcta 1560  
 acacgatata ggttacgact gcccgccta ctgcactac agcaatgca ctccagactac 1620  
 aggtgaaaag acgttcactc agaaggacgc tctttgtagg ttgagatctc atgtcaagca 1680  
 attccacgct aatgaataat caaggcatgt ttgagatcga caagggcttc cccatccaac 1740  
 gacactcttg ggcggccac accaccgta caaagaacat tgcttcaac atccgtgcca 1800  
 totacacaat cggaaactac gactacatga cgactacca gtttcactc gacggttcta 1860  
 tggaaatcga tgcagagca tcaggctaca tctctcggc ctctacgct gagaacgaag 1920  
 actacggttt caagatcac gacagcctt ccggatctct tcatgatcat gtcacacat 1980  
 tcaaaagcca ctttgacatc ttgggcgaga agaactctt gcaaaagatt gatatcaagc 2040  
 catcaactga gaagtgagta tccatttctg aacagggttt cttttacatc ttaactaatc 2100  
 ggaatagata caagtggct gatcagacac gcaacactat gaaggcagtc aagagcttca 2160  
 togacaacga agatgacgc aagatcaact ggtctccaa tggcgcaaca atgtatgctg 2220  
 tggtaacaa agacgagaag aacctctatg gagaagccc cgggtacagg gtgcaccag 2280  
 gttagtctca accgaacagc tgaaaaatac gacatccga ctaacatca aagcttctgg 2340  
 tgtggcatat ctccagtc aggattctc ggttatgcaa aacgcggtc accacacaac 2400  
 gcatcatctc tacgccctc gacaaaagga caacgagctc tacgcgttg gagcgtataa 2460  
 ttgccttact ccgaggacc ctccaggtga ctttaatgag tatttcaaca gcgagtcgct 2520  
 tgaccaagag gatatgtaag tattgtattt cccaccatgg catagacctg gctgacttg 2580  
 tgatacagtg ttctttggtt caacctggga atgcaccaca tgctcacaac aggtgatctt 2640  
 cccaacaccg tttctcaac cgcacctcc gctatgctca ttgagccat caactatctt 2700  
 atgggtgato ctccgaggc cagctctcag caagtotta tcaagactaa gaaggatggc 2760  
 aagcctgaga ttgttaacta tggcgctaag aatgcgacat gtgcgattga tatggatgt 2820  
 acctgatgt ctgtggtttt ttaccatgct aacatgactg attttaggca caactgaacc 2880  
 ctgatcttc gaactattct aacagtacta gtgttctcaa gtacccttc gatgggtcaa 2940  
 agccagaccg tcttgaggc gcgcc 2965

<210> 11

5 <211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>  
<223> Motivo consenso

<220>  
< 221> misc\_característica

5 < 222> (4)..(4)

< 223> Xaa puede ser Asn o Ser

<220>  
< 221> misc\_característica

< 222> (14)..(14)

10 < 223> Xaa puede ser Ile o Leu

<400> 11

Ile His Asp Xaa Leu Ser Gly Ser Met His Asp His Val Xaa Asn Phe  
1                    5                                    10    15

Lys

## REIVINDICACIONES

- 1.** Uso de un polipéptido que tiene actividad de lisil oxidasa y que comprende el siguiente motivo de aminoácidos, donde los residuos entre paréntesis indican redundancia admitida en dicho punto y los aminoácidos están en código de 1 letra:
- 5 - IHD[NS]LSGSMHDHV[IL]NFK,
- para catalizar la desaminación oxidativa de grupos lisil en una proteína o péptido en los correspondientes aldehídos, con la posterior reducción de O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- 2.** Uso del polipéptido según la reivindicación 1 por medio del cual el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 60 % de identidad secuencial con la secuencia de aminoácidos entera de cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 4.
- 10 **3.** Uso del polipéptido según la reivindicación 2 que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 65 %, preferiblemente al menos 70 %, más preferiblemente al menos 80 %, incluso más preferiblemente al menos 90 %, más preferiblemente al menos 95 % e incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 97 % de identidad con la secuencia de aminoácidos entera de cualquiera de SEQ ID NO: 1 a 4.
- 15 **4.** Uso del polipéptido según la reivindicación 2 que comprende cualquiera de las secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 a 4.
- 5.** El uso del polipéptido según la reivindicación 2 o el uso de la lisil oxidasa según la reivindicación 1, por medio del cual el polipéptido o lisil oxidasa se obtiene de un hongo, preferiblemente un *Aspergillus*, más preferiblemente de *Aspergillus nidulans*, *Cryptococcus neoformans*, *Podospora anserine* y *Fusarium graminearum*.
- 20 **6.** El uso del polipéptido según la reivindicación 2 o el uso de la lisil oxidasa según la reivindicación 1 para la preparación de un alimento o pienso o un nutracéutico o para la preparación de un producto intermediario para la preparación de un alimento o pienso o un nutracéutico.
- 7.** Un método para la producción de lisil oxidasa que comprende cultivar una célula hospedadora que comprende una construcción de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica para la lisil oxidasa que
- 25 comprende la secuencia de aminoácidos:
- IHD[NS]LSGSMHDHV[IL]NFK;
- en condiciones adecuadas para la producción de la lisil oxidasa; y recuperar la lisil oxidasa.
- 8.** Un proceso para identificar nuevas lisil oxidasas que comprende someter a barrido una secuencia de aminoácidos para determinar la presencia de las secuencias de aminoácidos:
- 30 - IHD[NS]LSGSMHDHV[IL]NFK
- y evaluar las lisil oxidasas identificadas para determinar la actividad de lisil oxidasa.
- 9.** Un proceso para modificar un producto alimentario o pienso que contiene una proteína, dicho método comprende modificar el producto alimentario o pienso al ponerlo en contacto con una lisil oxidasa que comprende el siguiente motivo de aminoácidos, donde los residuos entre paréntesis indican redundancia admitida en dicho punto y los aminoácidos están en código de 1 letra:
- 35 - IHD[NS]LSGSMHDHV[IL]NFK.
- 10.** Un proceso para la preparación de un aldehído reactivo en una proteína o péptido que comprende la desaminación oxidativa de lisil-amina de la proteína o péptido mediante una lisil oxidasa y preferiblemente concentrar y/o secar la proteína o péptido que contiene los aldehídos reactivos, por medio del cual la lisil oxidasa comprende el siguiente motivo de aminoácidos, donde los residuos entre paréntesis indican redundancia admitida en dicho punto y los aminoácidos están en código de 1 letra:
- 40 - IHD[NS]LSGSMHDHV[IL]NFK.
- 11.** Un proceso para la preparación de una proteína o péptido reticulado que comprende calentar una proteína o péptido que comprende aldehídos reactivos y prepararla según el proceso de la reivindicación 10, para reticular la proteína.
- 45

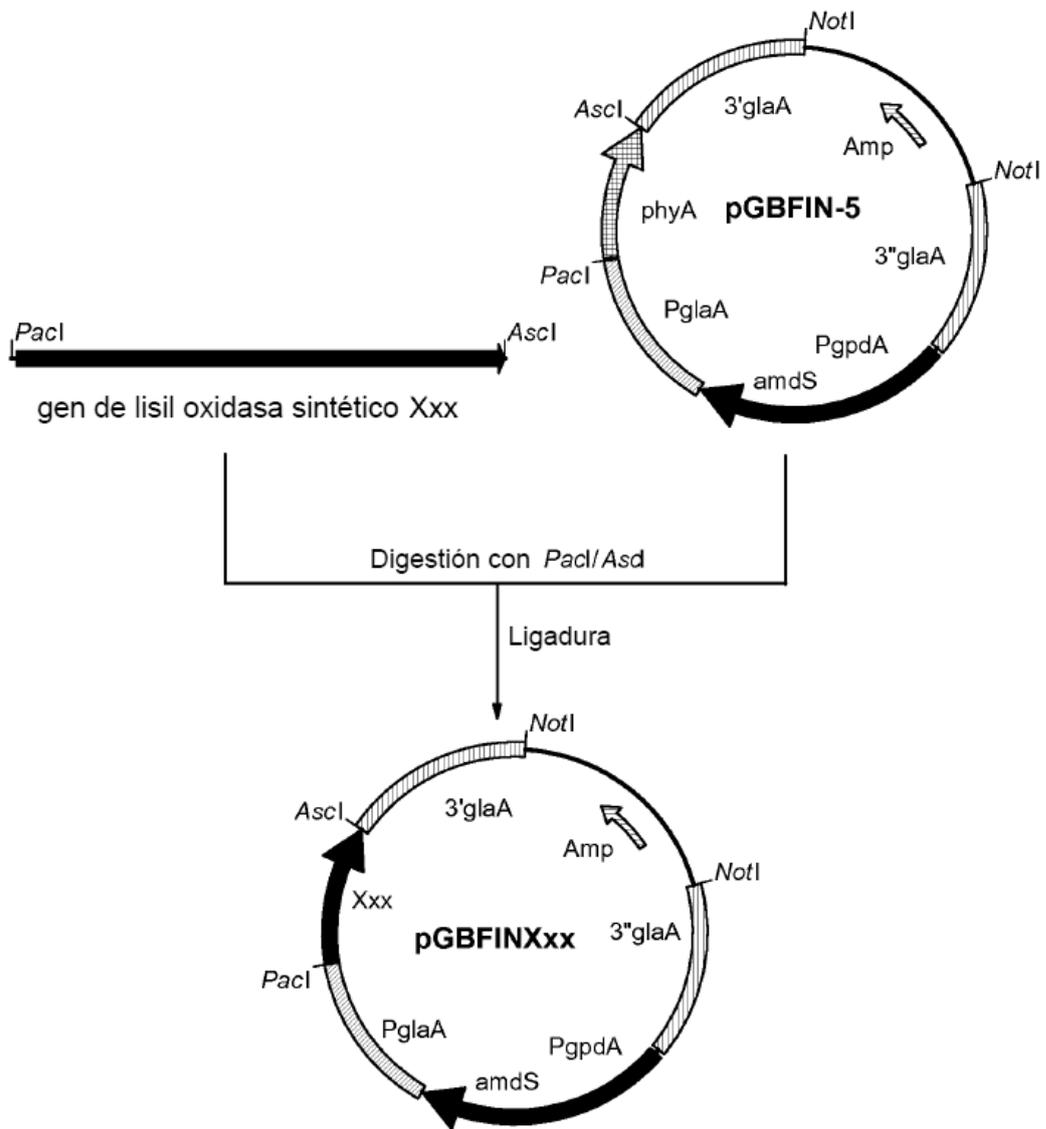


Figura 1

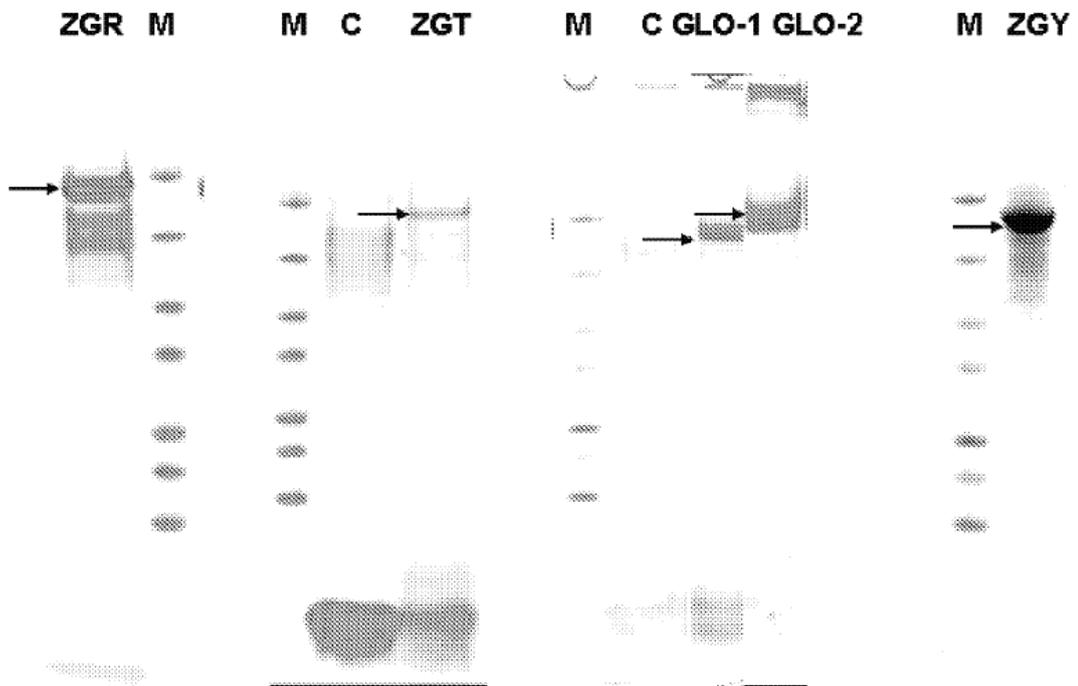


Figura 2

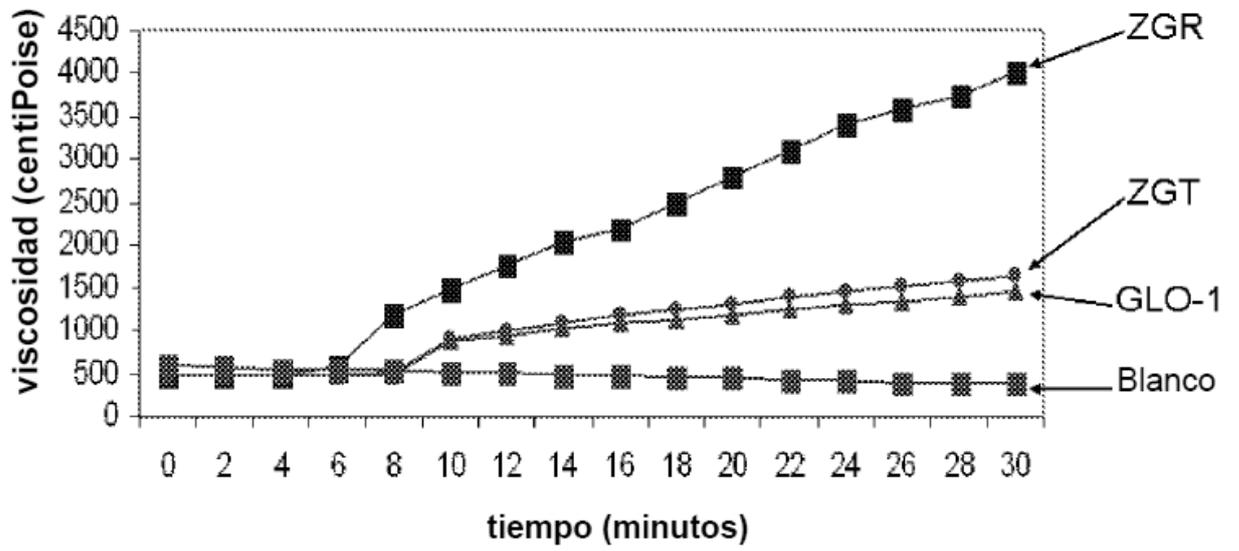


Figura 3

Marcador k-caseína + a-caseína k-caseína + a-caseína + ZGR k-caseína + ZGR a-caseína + ZGR Marcador

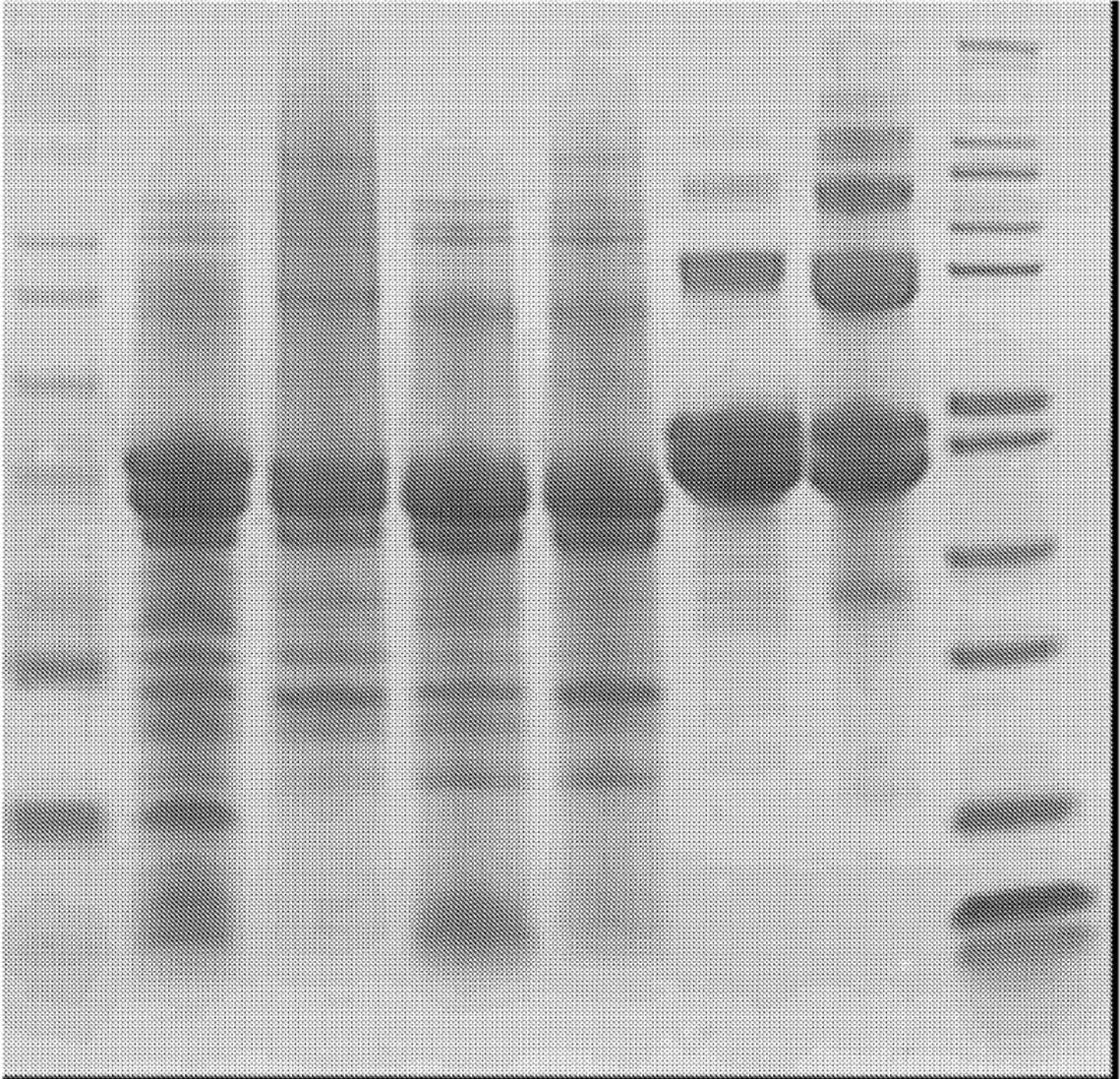


Figura 4