

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 631 605**

51 Int. Cl.:

A61K 38/47 (2006.01)

C12N 9/24 (2006.01)

C12N 9/36 (2006.01)

C12N 15/56 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.11.2012 PCT/EP2012/073493**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.05.2013 WO13076259**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.11.2012 E 12791173 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.04.2017 EP 2782593**

54 Título: **Polipéptidos con actividad de lisozima y polinucleótidos que codifican los mismos**

30 Prioridad:

25.11.2011 EP 11190690

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

01.09.2017

73 Titular/es:

NOVOZYMES A/S (100.0%)

Krogshøjvej 36

2880 Bagsvaerd, DK

72 Inventor/es:

SCHNORR, KIRK, MATTHEW

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 631 605 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos con actividad de lisozima y polinucleótidos que codifican los mismos

5 REFERENCIA A UN LISTADO DE SECUENCIAS

[0001] Esta solicitud contiene un listado de secuencias en forma legible por ordenador.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Campo de la invención

[0002] La presente invención se refiere a polipéptidos teniendo actividad de lisozima, dominios catalíticos, y polinucleótidos que codifican los polipéptidos y dominios catalíticos. La invención también se refiere a constructos de ácidos nucleicos, vectores, y células huésped comprendiendo los polinucleótidos al igual que métodos de producción y utilización de los polipéptidos y dominios catalíticos.

Descripción de las técnicas relacionadas

20 [0003] Lisozima es una O-glicosil hidrolasa producida como un mecanismo defensivo contra las bacterias por muchos organismos. La enzima provoca la hidrólisis de paredes celulares bacterianas dividiendo los enlaces glicosídicos de peptidoglicano; una molécula estructural importante en las bacterias. Después de tener sus paredes celulares debilitadas por la acción de las lisozimas, las células bacterianas lisan como resultado de la presión osmótica.

25 [0004] La lisozima se produce en muchos organismos tales como virus, plantas, insectos, pájaros, reptiles y mamíferos. En mamíferos, la lisozima ha sido aislada de secreciones nasales, saliva, lágrimas, intestinos, orina y leche. La enzima divide el enlace glicosídico entre número 1 de carbono de ácido N-acetilmurámico y número 4 de carbono de N-acetil-D-glucosamina. In vivo, estos dos carbohidratos se polimerizan para formar el polisacárido de pared celular.

30 [0005] Hay un interés en aumento en el potencial de enzimas lisozimas como agentes antimicrobianos. Por ejemplo, la actividad de lisozima ha sido mostrada contra los patógenos tal como *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus anthracis*, *Enterococcus faecium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium tyrobutyricum*, y *Listeria monocytogenes*.

35 [0006] La lisozima ha sido clasificada en cinco diferentes familias de glicósido hidrolasa (GH) (CAZy, www.cazy.org): lisozima de clara de huevo de gallina (GH22), lisozima de clara de huevo de oca (GH23), lisozima de bacteriófago T4 (GH24), proteína *Sphingomonas* flagelar (GH73) y lisozimas *Chalaropsis* (GH25). Lisozimas de las familias GH23 y GH24 son principalmente conocidas de bacteriófagos y no han sido identificadas en hongos. También se ha encontrado que la familia de lisozima GH25 no está relacionada estructuralmente con las otras familias de lisozima. La estructura de una lisozima GH25 de *Aspergillus fumigatus* se ha proporcionado por Korczynska en *Crystallographica section F, Structural Biology and Crystallisation Communications*, 2010, 66(9), 973-977 y Wohlkonig et al han publicado un artículo en: "Structural Relationships in the Lysozyme Superfamily: Significant Evidence for Glycoside Hydrolase Signature Motifs", *PLoS ONE*, 5, (11), e15388-e15388. El uso de lisozima ha sido sugerido en pienso para animales (véase por ejemplo WO 00/21381 y WO 04/026334), en la producción de queso (véase por ejemplo WO 05/080559), conservación alimenticia (WO2009/102755 y Hughey y Johnson (1987) *Appl Environ Microbiol* 53:2165), detergentes (véase por ejemplo US 5,041,236 y EP 0425016), en el cuidado bucal (ver por ejemplo US 4,355,022, WO 04/017988 y WO 08/124764), cosmetología y dermatología, anticoncepción, urología, y ginecología (véase por ejemplo WO 08/124764); y como agentes antimicrobianos (WO 2011/104339).

55 [0007] Una lisozima GH25 ha sido proporcionada de *Chalaropsis* (Felsch JW, Ingagami T, y Hash JH. (1975), "The N,O-Diacetylmuramidase of *Chalaropsis* species; V The complete amino acid sequence, *J. Biol. Chem.* 250(10):3713-3720).

60 [0008] Lisozima de clara de huevo de gallina que es el producto primario disponible en el mercado comercial, no disocia N,6-O-diacetilmuramidasa en por ejemplo paredes celulares de *Staphylococcus aureus* y es incapaz así de lisar este patógeno humano importante entre otros (Masschalck B, Deckers D, Michiels CW (2002), "Lytic and nonlytic mechanism of inactivation of gram-positive bacteria by lysozyme under atmospheric and high hydrostatic pressure", *J Food Prot.* 65(12):1916-23).

65 [0009] Se ha observado que lisozimas diferentes tienen especificidades diferentes hacia microorganismos diferentes. Es por lo tanto deseable tener diferentes lisozimas disponibles con el objetivo de poder

seleccionar enzimas adecuadas para cada aplicación particular. Polipéptidos nuevos que tienen actividad de lisozima son por lo tanto deseados.

RESUMEN DE LA INVENCION

5

[0010] La presente invención está relacionada con polipéptidos fúngicos aislados de las familias GH23 o GH24 y teniendo actividad de lisozima.

10

[0011] La presente invención se refiere además a polipéptidos aislados que tienen actividad de lisozima seleccionada del grupo que consiste en: (a) un polipéptido con al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100% identidad de secuencia a los aminoácidos 20 a 176 de SEQ ID N.º: 6; (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100% de identidad de secuencia a la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 5; (c) un polipéptido codificado por un polinucleótido que se hibrida bajo condiciones de astringencia altas o muy altas con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 5, o el complemento de longitud completa del mismo; (d) una variante del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 6, que comprende una sustitución, delección, y/o inserción en una o más (por ejemplo; diferentes) posiciones, donde los polipéptidos difieren de no más de 17 aminoácidos de los aminoácidos 20 a 176 de SEQ ID N.º: 6; y (e) un fragmento del polipéptido de (a); (b), (c) o (d) que tiene actividad de lisozima.

15

20

25

[0012] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican los polipéptidos de la presente invención; constructos de ácidos nucleicos; vectores de expresión recombinantes; células huésped recombinantes comprendiendo los polinucleótidos; y métodos de producción de los polipéptidos.

30

[0013] La presente invención también se refiere a los polipéptidos en la invención que tienen actividad antimicrobiana y métodos de uso de los polipéptidos en la invención como inhibidores de formación de biopelículas, en composiciones detergentes, en pienso para animales y para la extracción de ADN genómico bacteriano.

Visión general del listado de secuencias

35

[0014] SEQ ID N.º: 1 es la secuencia de ADN del gen P8EH GH23 aislado de *Aspergillus aculeatus* CBS 172.66. SEQ ID N.º: 2 es la secuencia de aminoácidos deducida de SEQ ID N.º: 1. SEQ ID N.º: 3 es la secuencia de ADN del gen P242MS GH24 aislado de *Acremonium alkalophilum* CBS114.92. SEQ ID N.º: 4 es la secuencia de aminoácidos deducida de SEQ ID N.º: 3. SEQ ID N.º: 5 es la secuencia de ADN del gen P244A7 GH24 aislado de *Acremonium alkalophilum* CBS114.92. SEQ ID N.º: 6 es la secuencia de aminoácidos deducida de SEQ ID N.º: 5. SEQ ID N.º: 7 es la secuencia de ADN del gen P242M9 GH25 aislado de *Acremonium alkalophilum* CBS114.92. SEQ ID N.º: 8 es la secuencia de aminoácidos deducida de SEQ ID N.º: 7. SEQ ID N.º: 9 es el cebador sentido F-P8EH. SEQ ID N.º: 10 es el cebador antisentido R-P8EH. SEQ ID N.º: 11 es el cebador sentido F-P242MS. SEQ ID N.º: 12 es el cebador antisentido R-P242MS. SEQ ID N.º: 13 es el cebador sentido F-P244A7. SEQ ID N.º: 14 es el cebador antisentido R-P244A7.

40

45

Breve descripción de las figuras

50

[0015] La Figura 1 muestra ensayos de difusión radial de lisozima GH24 de *Acremonium alkalophilum* (EXP03890, SEQ ID N.º: 6), lisozima GH25 de *Acremonium alkalophilum* (EXP03864, SEQ ID N.º: 8) y una lisozima de referencia de *Aspergillus fumigatus* GH25 en *S. carnosus* y *E.coli*.

DEFINICIONES

55

[0016] **Lisozima:** el término actividad de "lisozima" se define aquí como una O-glicosil hidrolasa, que cataliza la hidrólisis del enlace glicosídico entre dos o más carbohidratos, o entre un carbohidrato y una fracción sin carbohidratos. Las lisozimas disocian el enlace glicosídico entre ciertos residuos en mucopolisacáridos y mucopéptidos de paredes celulares bacterianas, tal como 1,4-beta-enlaces entre ácido N-acetilmurámico y residuos de N-acetil-D-glucosamina en un peptidoglicano y entre residuos de N-acetil-D-glucosamina en citodextrinas, dando como resultado bacteriolisis. La lisozima pertenece a la clase enzimática EC 3.2.1.17. Para los fines de la presente invención, actividad de lisozima se determina según el ensayo de turbidez descrito en ejemplo 5. En un aspecto, los polipéptidos de la presente invención tienen al menos 20%, por ejemplo, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 100% de la actividad de lisozima del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 6.

60

65

[0017] **Variante alélica:** el término "variante alélica" significa cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. Variación alélica surge naturalmente a través de mutación, y

puede resultar en polimorfismo dentro de poblaciones. Las mutaciones genéticas pueden ser silenciosas (sin cambio en el polipéptido codificado) o puede codificar polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos alteradas. Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

5 [0018] **Actividad antimicrobiana:** el término "actividad antimicrobiana" se define aquí como una actividad que mata o inhibe el crecimiento de microorganismos, tal como, algas, arquea, bacterias, hongos y/o protozoos. La actividad antimicrobiana puede por ejemplo ser bactericida significando la matanza de bacterias o bacteriostática significando la prevención del crecimiento bacteriano. La actividad antimicrobiana puede incluir catalizando la hidrólisis de 1,4-beta-enlaces entre ácido N-acetilmurámico y residuos de N-acetil-D-glucosamina en un peptidoglicano y entre residuos de N-acetil-D-glucosamina en quitodextrinas. 10 Actividad antimicrobiana puede también incluir la lisozima que se une a la superficie del microorganismo e que inhibe su crecimiento. El efecto antimicrobiano puede también incluir el uso de las lisozimas de la presente invención para activación de autolisinas bacterianas, como un inmunoestimulador, inhibiendo o reduciendo a otra lisozima de referencia y por un efecto de opsonina. Para fines de la presente invención, la actividad antimicrobiana se determina según el ensayo de difusión radial descrito en ejemplo 4. 15

[0019] **Propiedad alterada/modificada:** el término "propiedad alterada/modificada" se define aquí como una característica asociada a una variante que está alterada o modificada, como comparado relativamente a la lisozima progenitora o una secuencia de referencia identificada. La propiedad alterada o modificada puede ser una característica asociada a una variante que es mejorada, a menos que se declare de otro modo, con respecto a otra lisozima de referencia o la lisozima progenitora. Ejemplos de propiedades que se pueden alterar/modificar o mejorar son dados a continuación. 20

[0020] Termoestabilidad: el término "termoestabilidad" se refiere a la actividad de lisozima después de un periodo de incubación a temperatura elevada relativa al progenitor o una secuencia de referencia identificada, bien en un tampón o bajo condiciones tales como las que existen durante el almacenamiento/transporte de producto o condiciones similares a aquellas que existen durante el uso industrial de la variante. Una variante puede o no puede mostrar un perfil de actividad térmica alterada con respecto al progenitor. En un aspecto, la termoestabilidad de la variante con actividad de lisozima es al menos 1,0 veces, por ejemplo, al menos 1,1 veces, al menos 1,5 veces, al menos 1,8 veces, al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, y al menos 25 veces más termoestable que la secuencia progenitora o de referencia en la temperatura seleccionada. Preferiblemente la actividad es evaluada utilizando el ensayo de actividad de turbidez de lisozima descrito en la sección "Materiales y métodos". 25 30 35

[0021] Perfil de temperatura/Estabilidad de temperatura: el término "perfil de temperatura/estabilidad de temperatura" se refiere la enzima variante que muestra un perfil de temperatura modificado en comparación con la secuencia progenitora o de referencia identificada, donde el perfil de temperatura se determina como actividad de lisozima en función de la temperatura. La actividad a cada temperatura es preferiblemente indicada como actividad relativa (en %) normalizada al valor en la temperatura óptima. La temperatura óptima es aquella temperatura en las temperaturas evaluadas (es decir aquellas con saltos de 5-10°C) donde la actividad es máxima. 40

[0022] Estabilidad de pH: el término "estabilidad de pH" se refiere a la enzima variante que presenta estabilidad estructural relativa a la lisozima progenitora o una secuencia de referencia identificada, después de un periodo de incubación a un pH que está fuera del rango de pH donde la enzima es activa (rango de actividad de pH). Tal variante puede o no puede mostrar un perfil de actividad de pH alterado con respecto al progenitor. Por ejemplo, la variante no puede ser activa en el pH aumentado o disminuido, pero es capaz de mantener su estructura tridimensional y luego recuperar la actividad una vez que vuelve al campo de actividad de pH. Alternativamente, la variante puede tener una capacidad mejorada de repliegue con respecto al progenitor después de la incubación a pH aumentado o disminuido. 45 50

[0023] En un aspecto, el perfil de estabilidad de pH es alterado de manera que una variante de lisozima tiene estabilidad mejorada a pH ácido. Como se utiliza en este caso, pH ácido significa de pH 2 a 5,5, preferiblemente de 2,5 a 5,25, más preferiblemente de 3 a 5, aún más preferiblemente de 3,5 a 4. Preferiblemente, la lisozima variante mantiene al menos 40%, preferiblemente al menos 50%, 60%, 70% o 80%, más preferiblemente al menos 90%, aún más preferiblemente al menos 95% de actividad residual tras la incubación a un pH dado durante 1 hora cuando se compara con la variante que ha sido mantenida a pH 6,5 durante el mismo tiempo. Preferiblemente, la actividad residual de la lisozima variante es al menos 1,1 veces, al menos 1,3 veces, al menos 1,5 veces, preferiblemente al menos 2 veces, más preferiblemente al menos 5 veces, de la forma más preferible al menos 7 veces, e incluso de la forma más preferible al menos 10 veces superior a la actividad residual de la lisozima progenitora o una secuencia de referencia identificada que ha sido tratada bajo las mismas condiciones. Preferiblemente, la actividad es evaluada utilizando el ensayo de actividad de turbidez de lisozima descrito en la sección "Materiales y Métodos". 55 60 65

[0024] Perfil de actividad de pH: el término "perfil de actividad de pH" se define aquí como una lisozima variante que presenta una alteración del perfil de actividad dependiente del pH cuando se compara al perfil de actividad de pH de la lisozima progenitora o una secuencia de referencia identificada. El perfil de actividad de pH proporciona una medida de la eficiencia de la enzima para prevenir el crecimiento microbiano, eliminar células microbianas y/o realizar la catálisis de una reacción de hidrólisis sobre un rango de pH a condiciones dadas tal como temperatura y composición de solvente. Una lisozima tiene un rango de pH específico donde el polipéptido es estable y retiene su actividad enzimática, fuera de este rango la lisozima se vuelve menos activa y potencialmente también menos estable. En el rango de pH allí hay generalmente un pH óptimo, donde la lisozima muestra la actividad más alta.

[0025] Una variante de lisozima con actividad mejorada a pH alcalino (por ejemplo de pH 7,5 a 12, preferiblemente de 8 a 11, más preferiblemente de 8,5 a 10, aún más preferiblemente de 9 a 9,5) será capaz de funcionar en ambientes más alcalinos tales como detergentes.

[0026] Una variante con actividad mejorada a pH ácido (por ejemplo de pH 2 a 6,5, preferiblemente de 2,5 a 6, más preferiblemente de 3 a 5,5, aún más preferiblemente de 3,5 a 5) será capaz de funcionar bajo condiciones más ácidas, tal como conservante en ciertos alimentos o como una molécula eubiótica en piensos.

[0027] En un aspecto, el perfil de actividad de pH es alterado de manera que una variante de lisozima tiene actividad mejorada a un pH más alcalino. Preferiblemente, la actividad de la variante de lisozima a un pH al menos 0,5 unidades mayor, preferiblemente al menos 1,0 unidades de pH mayor, más preferiblemente al menos 1,5 unidades de pH mayor, aún más preferiblemente al menos 2,0 unidades de pH mayor es al menos 1,1 veces, preferiblemente al menos 1,5 veces, más preferiblemente al menos 2 veces, aún más preferiblemente al menos 5 veces y de la forma más preferible al menos 10 veces superior que los de la enzima progenitora o una secuencia de referencia identificada. Preferiblemente, la variante de lisozima al mismo tiempo mantiene al menos 40%, preferiblemente al menos 50%, 60%, 70% o 80%, o 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 100% de la actividad que presenta la lisozima progenitora o una secuencia de referencia identificada a su pH óptimo. Preferiblemente, la actividad es evaluada utilizando el ensayo de actividad de turbidez de lisozima descrito en la sección de "Materiales y Métodos".

[0028] En otro aspecto, el perfil de actividad de pH es alterado de manera que una variante de lisozima tiene actividad mejorada a un pH más ácido. Preferiblemente, la actividad de la variante de lisozima a un pH al menos 0,5 unidades más bajo, preferiblemente al menos 1,0 unidades de pH más bajo, más preferiblemente al menos 1,5 unidades de pH más bajo, aún más preferiblemente al menos 2,0 unidades de pH más bajo es al menos 1,1 veces, preferiblemente al menos 1,5 veces, más preferiblemente al menos 2 veces, aún más preferiblemente al menos 5 veces y de la forma más preferible al menos 10 veces superior que los de la enzima progenitora o una secuencia de referencia identificada. Preferiblemente, la variante de lisozima al mismo tiempo mantiene al menos 40%, preferiblemente al menos 50%, 60%, 70% o 80%, o 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 100% de la actividad que presenta la lisozima progenitora o una secuencia de referencia identificada a su pH óptimo. Preferiblemente, la actividad es evaluada utilizando el ensayo de actividad de turbidez de lisozima descrito en la sección "Materiales y Métodos".

[0029] Susceptibilidad de glicación: la glicación no enzimática es un proceso postraduccional espontáneo donde azúcares reductores se enlazan de manera covalente a grupos amino libres en proteínas principalmente en los residuos de lisina (K). La glicación puede impactar la actividad de la lisozima. Conforme a la presente invención, la susceptibilidad de la lisozima para glicación no enzimática se puede reducir por cambios aminoácidos específicos.

[0030] Propiedades mejoradas también pueden incluir propiedades térmicas, tal como estabilidad de granulación, estabilidad de vapor, perfil de actividad de temperatura más amplio. Además propiedades mejoradas pueden incluir sensibilidad de proteasa, y/o modelo de glicosilación. Mejoras son preferiblemente evaluadas en relación a las condiciones de aplicación deseadas.

[0031] **Dominio catalítico**: el término "dominio catalítico" significa la región de una enzima que contiene la maquinaria catalítica de la enzima.

[0032] **ADNc**: el término "ADNc" significa una molécula de ADN que se puede preparar por transcripción inversa a partir de una molécula de ARNm, madura, empalmada, obtenida a partir de una célula eucariótica o procariótica. ADNc carece de secuencias de intrones que pueden estar presentes en el ADN genómico correspondiente. El transcrito inicial primario de ARN es un precursor para ARNm que se procesa a través de una serie de pasos, incluyendo empalme, antes de aparecer como ARNm empalmado maduro.

[0033] **Secuencia codificante:** el término "secuencia codificante" significa un polinucleótido, que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de un polipéptido. Los límites de la secuencia codificante se determinan generalmente por un marco de lectura abierto, que empieza con un codón iniciador tal como, ATG, GTG, o TTG y termina con un codón terminador tal como, TAA, TAG, o TGA. La secuencia codificante puede ser un ADN genómico, ADNc, ADN sintético, o una combinación de los mismos.

[0034] **Secuencias de control:** el término "secuencias de control" significa secuencias de ácido nucleico necesarias para expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido maduro de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa (es decir, desde el mismo gen) o foránea (es decir, a partir de un gen diferente) al polinucleótido que codifica el polipéptido o nativos o foráneos entre sí. Tales secuencias de control incluyen, pero de forma no limitativa, una secuencia líder, secuencia de poliadenilación, secuencia de propéptido, promotor, secuencia de péptido señal, y terminador de la transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor, y señales de parada transcripcional y traduccional. Las secuencias de control se pueden proporcionar con enlazadores con el propósito de introducir sitios de restricción específicos facilitando el ligamiento de las secuencias de control con la región codificante del polinucleótido que codifica un polipéptido.

[0035] **Expresión:** el término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción de un polipéptido incluyendo, pero no limitado a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional, y secreción.

[0036] **Vector de expresión:** el término "vector de expresión" significa una molécula de ADN lineal o circular que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido y está operativamente enlazada a secuencias de control que proveen su expresión.

[0037] **Fragmento:** el término "fragmento" significa un polipéptido o un dominio catalítico con uno o más (por ejemplo; varios) aminoácidos ausentes del término amino y/o carboxilo terminal de un polipéptido maduro o dominio; donde el fragmento tiene actividad de lisozima. En un aspecto, un fragmento contiene al menos 150 residuos de aminoácidos (por ejemplo, aminoácidos 24 a 173 de SEQ ID N.º: 6).

[0038] **Célula huésped:** el término "célula huésped" significa cualquier tipo de célula que es susceptible de transformación, transfección, transducción, o similar con un constructo de ácidos nucleicos o vector de expresión que comprende un polinucleótido de la presente invención. El término "célula huésped" abarca cualquier progenie de una célula madre que no es idéntica a la célula madre debido a mutaciones que ocurren durante la replicación.

[0039] **Aislado:** el término "aislado" significa una sustancia en una forma o ambiente que no se produce en la naturaleza. Ejemplos no limitativos de sustancias aisladas incluyen (1) cualquier sustancia que no se produce de forma natural, (2) cualquier sustancia que incluye, pero no se limita a, cualquier enzima, variante, ácido nucleico, proteína, péptido o cofactor, que es al menos parcialmente eliminado de uno o más o todos los constituyentes de origen natural con los cuales se asocia en la naturaleza; (3) cualquier sustancia modificada por la mano del hombre con respecto a esta sustancia encontrada en la naturaleza; o (4) cualquier sustancia modificada mediante el aumento de la cantidad de la sustancia con respecto a otros componentes con los cuales se asocia naturalmente (por ejemplo, copias múltiples de un gen que codifica la sustancia; uso de un promotor más fuerte que el promotor naturalmente asociado al gen que codifica de la sustancia). Una sustancia aislada puede estar presente en una muestra de caldo de fermentación.

[0040] **Polipéptido maduro:** el término "polipéptido maduro" significa un polipéptido en su forma final después de la traducción y cualquier modificación postraduccional, tal como tratamiento N-terminal, truncamiento C-terminal, glicosilación, fosforilación, etc. En un aspecto, el polipéptido maduro es aminoácidos 20 a 176 de SEQ ID N.º: 6 basado en el programa SignalP (Nielsen et al., 1997, Protein Engineering 10: 1-6) que predice que los aminoácidos 1 a 19 de SEQ ID N.º: 6 son péptidos señal. Se conoce en la técnica que una célula huésped puede producir una mezcla de dos o más polipéptidos maduros diferentes (es decir, con un aminoácido diferente C-terminal y/o N-terminal) expresado por el mismo polinucleótido.

[0041] **Secuencia codificante del polipéptido maduro:** el término "Secuencia codificante del polipéptido maduro" significa un polinucleótido que codifica un polipéptido maduro teniendo actividad de lisozima. En un aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es la secuencia unida de nucleótidos 58 a 133, nucleótidos 215 a 345 y nucleótidos 516 a 779 de SEQ ID N.º: 5 basado en el programa SignalP (Nielsen et al., 1997, supra) que predice nucleótidos. los nucleótidos 1 a 57 de la SEQ ID N.º: 5 codifican péptidos señal.

[0042] **Constructo de ácidos nucleicos:** el término "Constructo de ácidos nucleicos" significa una molécula de ácido nucleico, bien mono o bicatenaria, que es aislada de un gen de origen natural o se modifica para contener segmentos de ácidos nucleicos en cierto modo que de otro modo no existirían en la naturaleza o que es sintético, que comprende una o más secuencias de control.

[0043] **Operativamente enlazado:** el término "operativamente enlazado" significa una configuración en la que una secuencia de control se coloca a una posición apropiada relativa a la secuencia de codificación de un polinucleótido de modo que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia codificante.

5 [0044] **Identidad de secuencias:** la relación entre dos secuencias de aminoácido o entre dos secuencias de nucleótidos es descrita por el parámetro "identidad de secuencias".

[0045] Para fines de la presente invención, la identidad de secuencias entre dos secuencias de aminoácidos es determinada utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) como se implementa en el programa de Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferiblemente versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros usados son penalización por apertura de gap de 10, penalización por extensión de gap de 0.5, y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión de EMBOSS de BLOSUM62). El resultado de Needle marcado "identidad más larga" (obtenido utilizando la opción -nobrief) se usa como el porcentaje de identidad y se calcula de la siguiente manera:

(Residuos idénticos x 100)/(Longitud de alineamiento – Número total de Gaps en Alineamiento)

20 [0046] Para fines de la presente invención, la identidad de secuencia entre dos secuencias desoxirribonucleótidas es determinada utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, supra) como se implementa en el programa de Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, supra), preferiblemente versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros usados son penalización por apertura de gap de 10, penalización por extensión de gap de 0.5, y la matriz de sustitución EDNAFULL (versión de EMBOSS de NCBI NUC4.4). El resultado de Needle etiquetado "identidad más larga" (obtenido utilizando la opción -nobrief) se usa como el porcentaje de identidad y se calcula de la siguiente manera:

30 (Desoxirribonucleótidos idénticos x 100)/(Longitud de alineamiento – Número total de Gaps en Alineamiento)

[0047] **Condiciones de astringencia:** las condiciones de astringencia diferentes son definidas de la siguiente manera.

35 [0048] El término "condiciones de astringencia muy baja" significa sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 0.3% SDS, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y 25% de formamida, después de procedimientos de Southern blot estándares durante 12 a 24 horas. El material portador es finalmente lavado tres veces cada uno durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0.2% SDS a 45°C.

40 [0049] El término "condiciones de astringencia baja" significa sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 0.3% SDS, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y 25% de formamida, después de procedimientos de transferencia de Southern estándares durante 12 a 24 horas. El material portador es finalmente lavado tres veces cada uno durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0.2% SDS a 50°C.

50 [0050] El término "condiciones de astringencia media" significa sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 0.3% SDS, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y 35% de formamida, después de procedimientos de Southern blot estándares durante 12 a 24 horas. El material portador es finalmente lavado tres veces cada uno durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0.2% SDS a 55°C.

55 [0051] El término "condiciones de astringencia media-alta" para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 0,3% SDS, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y 35% de formamida, después de procedimientos de Southern blot estándares durante 12 a 24 horas. El material portador es finalmente lavado tres veces cada uno durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0.2% SDS a 60°C.

60 [0052] El término "condiciones de astringencia alta" significa sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 0,3% SDS, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y 50% formamida, después de procedimientos de Southern blot estándares durante 12 a 24 horas. El material portador es finalmente lavado tres veces cada uno durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0,2% SDS a 65°C.

[0053] El término "condiciones de astringencia muy alta" significa sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 0.3% SDS, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y 50% de formamida, después de procedimientos de Southern blot estándares durante 12 a 24 horas. El material portador es finalmente lavado tres veces cada uno durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0,2% SDS a 70°C.

[0054] **Subsecuencia:** el término "subsecuencia" significa un polinucleótido que tiene uno o más (por ejemplo; varios) nucleótidos ausentes del extremo 5' y/o 3' de una secuencia codificante del polipéptido maduro; donde la subsecuencia codifica un fragmento con actividad de lisozima. En un aspecto, una subsecuencia contiene al menos 450 nucleótidos (por ejemplo, la secuencia de conexión de nucleótidos 70 a 133, nucleótidos 215 a 345 y nucleótidos 516 a 770 de SEQ ID N.º: 5).

[0055] **Polinucleótido sustancialmente puro:** el término "Polinucleótido sustancialmente puro" significa una preparación de polinucleótido libre de otros nucleótidos extraños o no deseados y en una forma adecuada para el uso dentro de sistemas de producción de polipéptidos genéticamente modificados. Así, un polinucleótido sustancialmente puro contiene como mucho 10%, como mucho 8%, como mucho 6%, como mucho 5%, como mucho 4%, como mucho 3%, como mucho 2%, como mucho 1%, y como mucho 0,5% en peso de otro material de polinucleótido con el cual se asocia originalmente o recombinantemente. Un polinucleótido sustancialmente puro puede, sin embargo, incluir regiones no traducidas 5' y 3' de origen natural, tales como promotores y terminadores. Preferiblemente, el polinucleótido es al menos 90% puro, por ejemplo, al menos 92% puro, al menos 94% puro, al menos 95% puro, al menos 96% puro, al menos 97% puro, al menos 98% puro, al menos 99% puro, y al menos 99,5% puro en peso. Los polinucleótidos de la presente invención están preferiblemente en una forma sustancialmente pura.

[0056] **Polipéptido sustancialmente puro:** el término "polipéptido sustancialmente puro" significa una preparación que contiene como mucho 10%, como mucho 8%, como mucho 6%, como mucho 5%, como mucho 4%, como mucho 3%, como mucho 2%, como mucho 1%, y como mucho 0,5% en peso de otro material de polipéptido con el cual se asocia originalmente o recombinantemente. Preferiblemente, el polipéptido es al menos 92% puro, por ejemplo, al menos 94% puro, al menos 95% puro, al menos 96% puro, al menos 97% puro, al menos 98% puro, al menos 99%, al menos 99,5% puro, y 100% en peso puro del material de polipéptido total presente en la preparación. Los polipéptidos de la presente invención están preferiblemente en una forma sustancialmente pura. Esto puede ser realizado, por ejemplo, preparando el polipéptido por métodos recombinantes bien conocidos o por métodos de purificación tradicionales.

[0057] **Variante:** el término "variante" significa un polipéptido con actividad de lisozima que incluye una alteración, es decir, una sustitución, inserción, y/o delección, de uno o más (varios) residuos de aminoácidos en una o más (por ejemplo; varias) posiciones. Una sustitución significa sustitución del aminoácido que ocupa una posición con un aminoácido diferente; una delección significa la eliminación del aminoácido que ocupa una posición; y una inserción significa la adición de 1, 2, o 3 aminoácidos adyacentes a e inmediatamente después del aminoácido que ocupa la posición. Una variante según la invención puede comprender de 1 a 5; de 1 a 10; de 1 a 15; es decir 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 alteraciones.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Polipéptidos que tienen actividad de lisozima

[0058] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen una identidad de secuencias a los aminoácidos 20 a 176 de SEQ ID N.º: 6 de al menos 90% que tienen actividad de lisozima.

[0059] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen una identidad de secuencias a los aminoácidos 20 a 176 de SEQ ID N.º: 6 de al menos 91% que tienen actividad de lisozima.

[0060] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen una identidad de secuencias a los aminoácidos 20 a 176 de SEQ ID N.º: 6 de al menos 92% que tienen actividad de lisozima.

[0061] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen una identidad de secuencias a los aminoácidos 20 a 176 de SEQ ID N.º: 6 de al menos 93% que tienen actividad de lisozima.

[0062] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen una identidad de secuencias a los aminoácidos 20 a 176 de SEQ ID N.º: 6 de al menos 94% que tienen actividad de lisozima.

[0063] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen una identidad de secuencia a los aminoácidos 20 a 176 de SEQ ID N.º: 6 de al menos 95% que tienen actividad de lisozima.

5 [0064] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen una identidad de secuencia a los aminoácidos 20 a 176 de SEQ ID N.º: 6 de al menos 96% que tienen actividad de lisozima.

10 [0065] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen una identidad de secuencias a los aminoácidos 20 a 176 de SEQ ID N.º: 6 de al menos 97% que tienen actividad de lisozima.

15 [0066] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen una identidad de secuencias a los aminoácidos 20 a 176 de SEQ ID N.º: 6 de al menos 98% que tienen actividad de lisozima.

20 [0067] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen una identidad de secuencias a los aminoácidos 20 a 176 de SEQ ID N.º: 6 de al menos 99% que tienen actividad de lisozima.

[0068] En un aspecto, los polipéptidos difieren de no más de 17 aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16, de los aminoácidos 20 a 176 de SEQ ID N.º: 6.

25 [0069] Un polipéptido de la presente invención preferiblemente comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 6 o una variante alélica del mismo; o es un fragmento del mismo que tiene actividad de lisozima. En otro aspecto, el polipéptido comprende o consiste en los aminoácidos 20 a 176 de SEQ ID N.º: 6. En otro aspecto, el polipéptido comprende o consiste en los aminoácidos 20 a 176 de SEQ ID N.º: 6.

30 [0070] En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un polipéptido aislado teniendo actividad de lisozima codificada por un polinucleótido que se hibrida bajo condiciones de astringencia media, condiciones de astringencia media alta, condiciones de astringencia alta, o condiciones de astringencia muy alta con la secuencia codificante del polipéptido maduro de (i) SEQ ID N.º: 5, (ii) la secuencia de ADNc de la misma, o (iii) el complemento en toda su longitud de (i) o (ii) (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor, New York).

35 [0071] El polinucleótido de SEQ ID N.º: 1, SEQ ID N.º: 3 o SEQ ID N.º: 5 o una subsecuencia de la misma, al igual que el polipéptido de SEQ ID N.º: 2, SEQ ID N.º: 4 o SEQ ID N.º: 6 o un fragmento de la misma, se pueden utilizar para diseñar sondas de ácido nucleico para identificar y clonar polipéptidos codificantes de ADN que tienen actividad de lisozima de cepas de diferentes géneros o especies según métodos bien conocidos en la técnica. En particular, tales sondas se pueden usar para hibridación con el ADN genómico o ADNc de una célula de interés, después de procedimientos de Southern blot estándares, para identificar y aislar el gen correspondiente en el mismo. Tales sondas pueden ser considerablemente más cortas que la secuencia entera, pero deberían ser al menos 15, por ejemplo, al menos 25, al menos 35, o al menos 70 nucleótidos de longitud. Preferiblemente, la sonda de ácidos nucleicos es al menos 100 nucleótidos de longitud, por ejemplo, al menos 200 nucleótidos, al menos 300 nucleótidos, al menos 400 nucleótidos, al menos 500 nucleótidos, al menos 600 nucleótidos, al menos 700 nucleótidos, al menos 800 nucleótidos, o al menos 900 nucleótidos de longitud. Tanto sondas de ADN como de ARN pueden usarse. Las sondas son típicamente marcadas para la detección del gen correspondiente (por ejemplo, con 32P, 3H, 35S, biotina, o avidina). Tales sondas están comprendidas por la presente invención.

40 [0072] Una biblioteca de ADN genómico o de ADNc obtenida a partir de tales otras cepas se pueden seleccionar para ADN que se hibrida con las sondas anteriormente descritas y codifica un polipéptido con actividad de lisozima. ADN genómico u otro de tales otras cepas se pueden separar por electroforesis en gel de poliacrilamida o agarosa, u otras técnicas de separación. ADN de las bibliotecas o el ADN separado se pueden transferir e inmovilizar en la nitrocelulosa u otro material portador adecuado. Para identificar un clon o ADN que se hibrida con SEQ ID N.º: 1, SEQ ID N.º: 3 o SEQ ID N.º: 5 o una subsecuencia de la misma, el material portador se usa en un Southern blot.

45 [0073] Para fines de la presente invención, hibridación indica que el polinucleótido se hibrida a una sonda de ácidos nucleicos marcada que corresponde con (i) SEQ ID N.º: 5; (ii) la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 5; (iii) la secuencia de ADNc de la misma (iv) el complemento en toda la longitud de la misma; o (v) una subsecuencia de la misma; bajo condiciones de astringencia alta a muy alta. Las moléculas a las que la sonda de ácidos nucleicos se hibrida bajo estas condiciones se pueden detectar usando, por ejemplo, película radiográfica o cualquiera de los otros medios de detección conocidos en la técnica.

[0074] En un aspecto, la sonda de ácidos nucleicos es nucleótidos 58 a 133, nucleótidos 215 a 345 o nucleótidos 516 a 779 de SEQ ID N.º: 5. En otro aspecto, la sonda de ácidos nucleicos es un polinucleótido que codifica el polipéptido de SEQ ID N.º: 6; el polipéptido maduro de la misma; o un fragmento de la misma. En otro aspecto, la sonda de ácidos nucleicos es SEQ ID N.º: 5 o la secuencia de ADNc de la misma.

5

[0075] En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un polipéptido aislado que tiene actividad de lisozima codificada por un polinucleótido con una identidad de secuencias a la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 5 o la secuencia de ADNc del mismo de al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100%.

10

[0076] En una forma de realización adicional, la presente invención se refiere a variantes de los aminoácidos 20 a 176 de SEQ ID N.º: 6 que comprenden una sustitución, delección, y/o inserción en una o más (por ejemplo; varias) posiciones. En una forma de realización, el número de sustituciones de aminoácidos, delecciones y/o inserciones introducidas en los aminoácidos 20 a 176 de SEQ ID N.º: 6 no es más de 17, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16.

15

[0077] Los cambios de aminoácidos pueden ser de una naturaleza menor, es decir sustituciones o inserciones conservadoras de aminoácidos que no afectan significativamente al doblamiento y/o actividad de la proteína; delecciones pequeñas, típicamente de 1-30 aminoácidos; pequeñas extensiones amino o carboxilo terminales, tal como un residuo de metionina aminoterminal; un péptido de enlazador pequeño de hasta 20-25 residuos; o una extensión pequeña que facilita la purificación cambiando la carga neta u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión.

20

[0078] Ejemplos de sustituciones conservadoras están en los grupos de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina). Sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran la actividad específica se conocen en la técnica y están descritas, por ejemplo, por H. Neurath y R.L. Hill, 1979, en, *The Proteins*, Academic Press, New York. Sustituciones comunes son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, y Asp/Gly.

25

30

[0079] Alternativamente, los cambios aminoácidos son de tal naturaleza que las propiedades físicoquímicas de los polipéptidos son alteradas. Por ejemplo, cambios aminoácidos pueden mejorar la termoestabilidad del polipéptido, alterar la especificidad de sustrato, cambiar el pH óptimo, y similares.

35

[0080] Aminoácidos esenciales en un polipéptido se pueden identificar según procedimientos conocidos en la técnica, tal como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de escaneado de alanina (Cunningham and Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085). En la técnica anterior, mutaciones de alanina únicas se introducen en cada residuo en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se evalúan para actividad de lisozima para identificar residuos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula. Véase también, Hilton et al., 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 4699-4708. El sitio activo de la enzima u otra interacción biológica puede también ser determinado por análisis físico de estructura, como se determina por tales técnicas como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción electrónica, o marcaje por fotoafinidad, conjuntamente con mutación de aminoácidos de sitio de contacto putativo. Véase, por ejemplo, de Vos et al., 1992, *Science* 255: 306-312; Smith et al., 1992, *J. Mol. Biol.* 224: 899-904; Wlodaver et al., 1992, *FEBS Lett.* 309: 59-64. La identidad de aminoácidos esenciales también pueden ser inferida de un alineamiento con un polipéptido relacionado.

40

45

50

[0081] Sustituciones de aminoácidos únicas o múltiples, delecciones, y/o inserciones pueden ser hechas y evaluadas usando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación, y/o redistribución, seguido de un procedimiento de selección pertinente, tal como los descritos por Reidhaar-Olson y Sauer, 1988, *Science* 241: 53-57; Bowie y Sauer, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2152-2156; WO 95/17413; o WO 95/22625. Otros métodos que se pueden usar incluyen PCR con tendencia al error, presentación en el fago (por ejemplo, Lowman et al., 1991, *Biochemistry* 30: 10832-10837; patente estadounidense nº 5,223,409; WO 92/06204), y mutagénesis dirigida a la región (Derbyshire et al., 1986, *Gene* 46: 145; Ner et al., 1988, *DNA* 7: 127).

55

[0082] Métodos de mutagénesis/redistribución se pueden combinar con alto rendimiento, métodos de selección automatizados para detectar actividad de polipéptidos clonados, mutagenizados expresados por células huésped (Ness et al., 1999, *Nature Biotechnology* 17: 893-896). Moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos activos se pueden recuperar de las células huésped y secuenciar rápidamente usando métodos estándar en la técnica. Estos métodos permiten la determinación rápida de la importancia de residuos de aminoácidos individuales en un polipéptido.

60

65

[0083] El polipéptido puede ser un polipéptido híbrido donde una región de un polipéptido se fusiona en el N-término o el C-término de una región de otro polipéptido.

5 [0084] El polipéptido puede ser un polipéptido de fusión o polipéptido de fusión escindible donde otro polipéptido se fusiona en el N-término o el C-término del polipéptido de la presente invención. Un polipéptido de fusión se produce por la fusión de un polinucleótido que codifica otro polipéptido a un polinucleótido de la presente invención. Técnicas para producir polipéptidos de fusión se conocen en la técnica, e incluyen ligar las secuencias codificantes que codifican los polipéptidos de modo que éstas están en marco y que la expresión del polipéptido de fusión está bajo control del mismo promotor(es) y terminador. Polipéptidos de fusión también se pueden construir usando tecnología de inteína donde los polipéptidos de fusión se crean postraduccionalmente (Cooper et al., 1993, EMBO J. 12: 2575-2583; Dawson et al., 1994, Science 266: 776-779).

15 [0085] Un polipéptido de fusión puede además comprender un sitio de escisión entre los dos polipéptidos. Tras la secreción de la proteína de fusión, el sitio es dividido liberando los dos polipéptidos. Ejemplos de sitios de escisión incluyen, pero de forma no limitativa, los sitios descritos en Martin et al., 2003, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 3: 568-576; Svetina et al., 2000, J. Biotechnol. 76: 245-251; Rasmussen-Wilson et al., 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63: 3488-3493; Ward et al., 1995, Biotechnology 13: 498-503; y Contreras et al., 1991, Biotechnology 9: 378-381; Eaton et al., 1986, Biochemistry 25: 505-512; Collins-Racie et al., 1995, Biotechnology 13: 982-987; Carter et al., 1989, Proteins: Structure, Function, and Genetics 6: 240-248; y Stevens, 2003, Drug Discovery World 4: 35-48.

Fuentes de polipéptidos que tienen actividad de lisozima

25 [0086] Un polipéptido con actividad de lisozima de la presente invención se puede obtener de microorganismos de cualquier género. Para fines de la presente invención, el término "obtenido de" como se utiliza en este caso en relación con una fuente dada debe significar que el polipéptido codificado por un polinucleótido se produce por la fuente o por una cepa donde el polinucleótido de la fuente ha sido insertado. En un aspecto, el polipéptido obtenido a partir de una fuente dada es secretado extracelularmente.

30 [0087] El polipéptido puede ser un polipéptido fúngico. Por ejemplo, el polipéptido puede ser un polipéptido fúngico filamentoso tal como un polipéptido de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Chrysosporium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Penicillium*, *Thielavia* o *Trichoderma*.

35 [0088] En otro aspecto, el polipéptido es un polipéptido de *Acremonium cellulolyticum*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochromum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola grisea*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Irpep lacteus*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Thielavia achromatica*, *Thielavia albomyces*, *Thielavia albopilosa*, *Thielavia australeinsis*, *Thielavia fimeti*, *Thielavia microspora*, *Thielavia ovispora*, *Thielavia peruviana*, *Thielavia setosa*, *Thielavia spededonium*, *Thielavia subthermophila*, *Thielavia terrestris*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, o *Trichoderma viride*.

50 [0089] En otro aspecto, el polipéptido es un polipéptido de *Acremonium alcalophilum*, por ejemplo, un polipéptido obtenido de *Acremonium alcalophilum* CBS 114.92.

55 [0090] Se entiende que para las especies anteriormente mencionadas, la invención abarca los estados perfectos e imperfectos, y otros equivalentes taxonómicos, por ejemplo, anamorfos, independientemente del nombre de la especie por el que se conocen. Expertos en la técnica reconocerán fácilmente la identidad de equivalentes apropiados.

60 [0091] Cepas de estas especies son fácilmente accesibles al público en un número de colecciones de cultivos, tales como American Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS), y Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

65 [0092] El polipéptido se puede identificar y obtener de otras fuentes incluyendo microorganismos aislados de la naturaleza (por ejemplo, suelo, abonos, agua, etc.) o muestras de ADN obtenidas directamente de materiales naturales (por ejemplo, suelo, abonos, agua, etc.) utilizando las sondas anteriormente

mencionadas. Técnicas para el aislamiento de microorganismos y ADN directamente de hábitats naturales se conocen en la técnica. Un polinucleótido que codifica el polipéptido puede luego ser obtenido seleccionando de forma similar de una genoteca de ADN genómico o ADNc de otro microorganismo o muestra de ADN mezclado. Una vez que un polinucleótido que codifica un polipéptido ha sido detectado con la(s) sonda(s), el polinucleótido se puede aislar o clonar utilizando técnicas que se conocen por aquellos técnicos en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, supra).

Polinucleótidos

[0093] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican un polipéptido de la presente invención, como se describe en este caso.

[0094] Las técnicas usadas para aislar o clonar un polinucleótido se conocen en la técnica e incluyen aislamiento de ADN genómico o ADNc, o una combinación de los mismos. La clonación de los polinucleótidos de ADN genómico puede ser efectuada, por ejemplo, usando la reacción en cadena de polimerasa (PCR) bien conocida o selección de anticuerpos de bibliotecas de expresión para detectar fragmentos de ADN clonados con características estructurales compartidas. Véase, por ejemplo, Innis et al., 1990, PCR: A Guide to Methods and Application, Academic Press, New York. Otros procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos tal como reacción en cadena de la ligasa (LCR), transcripción activada por ligamiento (LAT) y amplificación basada en polinucleótidos (NASBA) pueden ser utilizados. Los polinucleótidos se pueden clonar a partir de una cepa de *Aspergillus* o *Acremonium*, o un organismo relacionado y así, por ejemplo, puede ser una variante alélica o de especie de la región codificante del polipéptido del polinucleótido.

[0095] La modificación de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser necesaria para la sintetización de polipéptidos sustancialmente similar al polipéptido. El término "sustancialmente similar" al polipéptido se refiere a formas del polipéptido que no se producen de forma natural. Estos polipéptidos pueden diferir en alguna vía diseñada del polipéptido aislado de su fuente nativa, por ejemplo, variantes que difieren de la actividad específica, termoestabilidad, pH óptimo, o similar. Las variantes se pueden construir basándose en el polinucleótido presentado como la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 5 o las secuencias de ADNc de la misma, por ejemplo, una subsecuencia de la misma, y/o introduciendo sustituciones de nucleótidos que no suponen un cambio en la secuencia de aminoácidos del polipéptido, pero que corresponden al uso del codón del organismo huésped destinado a la producción de la enzima, o introduciendo sustituciones de nucleótidos que pueden dar lugar a una secuencia de aminoácidos diferente. Para una descripción general de sustitución de nucleótidos, véase, por ejemplo Ford et al., 1991, Protein Expression and Purification 2: 95-107.

Constructos de ácidos nucleicos

[0096] La presente invención también se refiere a constructos de ácidos nucleicos que comprenden un polinucleótido de la presente invención operativamente enlazado a una o más secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

[0097] Un polinucleótido se puede manipular en una variedad de vías para proveer la expresión del polipéptido. La manipulación del polinucleótido antes de la inserción en un vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para la modificación de polinucleótidos utilizando métodos de ADN recombinante se conocen en la técnica.

[0098] La secuencia de control puede ser un promotor, un polinucleótido reconocido por una célula huésped para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. El promotor contiene secuencias de control transcripcionales que median la expresión del polipéptido. El promotor puede ser cualquier polinucleótido que muestra actividad transcripcional en la célula huésped incluyendo promotores mutantes, truncados, e híbridos, y puede ser obtenido de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares bien homólogos o heterólogos a la célula huésped.

[0099] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácidos nucleicos de la presente invención en una célula huésped bacteriana son los promotores obtenidos del gen de alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (*amyQ*), gen de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (*amyL*), gen de penicilinas de *Bacillus licheniformis* (*penP*), gen de amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus* (*amyM*), gen de levansucrasa de *Bacillus subtilis* (*sacB*), genes *xylA* y *xylB* de *Bacillus subtilis*, gen *crIIIa* de *Bacillus thuringiensis* (Agaisse y Lereclus, 1994, Molecular Microbiology 13: 97-107), operón *lac* de *E. Coli*, promotor *trc* de *E. Coli* (Egon et al., 1988, Gene 69: 301-315), gen de agarasa de *Streptomyces coelicolor* (*dagA*), y gen de beta-lactamasa procariótica (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 3727-3731), al igual que el promotor *tac* (DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 21-25). Otros promotores son descritos en "Useful proteins from recombinant bacteria" en Gilbert et al., 1980, Scientific

American 242: 74-94; y en Sambrook et al., 1989, supra. Ejemplos de promotores en serie se describen en WO 99/43835.

5 [0100] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácidos nucleicos de la presente invención en una célula huésped fúngica filamentosa son promotores obtenidos de los genes para acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, alfa-amilasa estable en ácido de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger* o *Aspergillus awamori* (*glaA*), TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*,
 10 proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), amiloglucosidasa de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), *Fusarium venenatum* Daria (WO 00/56900), *Fusarium venenatum* Quinn (WO 00/56900), lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa I de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*,
 15 endoglucanasa IV de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, xilanasa I de *Trichoderma reesei*, xilanasa II de *Trichoderma reesei*, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei*, al igual que el promotor NA2-tpi (un promotor modificado de un gen de alfa-amilasa neutra de *Aspergillus* donde el líder no traducido ha sido sustituido por un líder no traducido de un gen de triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus*; ejemplos no limitativos incluyen promotores modificados de un gen de alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* donde el líder no traducido ha sido sustituido por un líder no traducido de un gen de triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans* o de *Aspergillus oryzae*); y promotores mutantes, truncados, e híbridos de los mismos.

25 [0101] En un huésped de levadura, promotores útiles se obtienen de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), galactocinasa de *Saccharomyces cerevisiae* (GAL1), alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH1, ADH2/GAP), triosa fosfato isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae* (TP1), metalotioneína de *Saccharomyces cerevisiae* (CUP1), y 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros promotores útiles para células huésped de levadura son descritas por Romanos et al., 1992, *Yeast* 8: 423-488.

30 [0102] La secuencia de control también puede ser un terminador de transcripción, que se reconoce por una célula huésped para terminar la transcripción. El terminador está operativamente enlazado al término 3' del polinucleótido que codifica el polipéptido. Cualquier terminador que es funcional en la célula huésped se puede utilizar en la presente invención.

35 [0103] Los terminadores preferidos para células huésped bacterianas son obtenidos de los genes para proteasa alcalina de *Bacillus clausii* (*aprH*), alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (*amyL*), y RNA ribosómico de *Escherichia coli* (*rrnB*).

40 [0104] Los terminadores preferidos para células huésped fúngicas filamentosas son obtenidos de los genes para antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, y proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.

45 [0105] Los terminadores preferidos para células huésped de levadura son obtenidos de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, citocromo C de *Saccharomyces cerevisiae* (CYC1), y gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros terminadores útiles para células huésped de levadura son descritos por Romanos et al., 1992, supra.

50 [0106] La secuencia de control también puede ser una región de estabilizadora de ARNm corriente abajo de un promotor y corriente arriba de la secuencia codificante de un gen que aumenta la expresión del gen.

[0107] Ejemplos de regiones estabilizadoras de ARNm adecuados se obtienen a partir de un gen *crIIIa* de *Bacillus thuringiensis* (WO 94/25612) y un gen SP82 de *Bacillus subtilis* (Hue et al., 1995, *Journal of Bacteriology* 177: 3465-3471).

55 [0108] La secuencia de control también puede ser un líder, una región no traducida de un ARNm que es importante para la traducción por la célula huésped. El líder está operativamente enlazado al término 5' del polinucleótido que codifica el polipéptido. Cualquier líder que es funcional en la célula huésped puede ser utilizado.

60 [0109] Líderes preferidos para células huésped fúngicas filamentosas son obtenidos de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

65 [0110] Líderes adecuados para células huésped de levadura son obtenidos de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, y alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH2/GAP).

- 5 [0111] La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia operativamente enlazada al término 3' del polinucleótido y, cuando se transcribe, se reconoce por la célula huésped como una señal para añadir residuos de poliadenosina al ARNm transcrito. Cualquier secuencia de poliadenilación que es funcional en la célula huésped puede ser utilizada.
- 10 [0112] Secuencias de poliadenilación preferidas para células huésped fúngicas filamentosas son obtenidas de los genes para antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, y proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.
- 15 [0113] Secuencias de poliadenilación útiles para células huésped de levadura son descritas por Guo y Sherman, 1995, Mol. Cellular Biol. 15: 5983-5990.
- 20 [0114] La secuencia de control también puede ser una región codificante del péptido señal que codifica un péptido señal enlazado al N-término de un polipéptido y dirige el polipéptido en la vía secretora de la célula. El extremo 5' de la secuencia codificante del polinucleótido puede intrínsecamente contener una secuencia codificante del péptido señal naturalmente enlazada en el marco de lectura de traducción con el segmento de la secuencia codificante que codifica el polipéptido. Alternativamente, el extremo 5' de la secuencia codificante puede contener una secuencia codificante del péptido señal que es foráneo a la secuencia codificante. Una secuencia codificante del péptido señal foráneo se puede requerir donde la secuencia codificante naturalmente no contiene una secuencia codificante del péptido señal. Alternativamente, una secuencia codificante del péptido señal foráneo puede sencillamente reemplazar la secuencia codificante del péptido señal natural para mejorar la secreción del polipéptido. Sin embargo, cualquier secuencia codificante del péptido señal que dirige el polipéptido expresado en la vía secretora de una célula huésped puede ser utilizada.
- 25 [0115] Secuencias codificantes del péptido señal eficaces para células huésped bacterianas son las secuencias codificantes del péptido señal obtenidas de los genes para amilasa maltogénica NCIB 11837 de *Bacillus*, subtilisina de *Bacillus licheniformis*, beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis*, alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, proteasas neutras de *Bacillus stearothermophilus* (*nprT*, *nprS*, *nprM*), y *prsA* de *Bacillus subtilis*. Otros péptidos señal son descritos por Simonen y Palva, 1993, Microbiological Reviews 57: 109-137.
- 30 [0116] Las secuencias codificantes del péptido señal eficaces para células huésped fúngicas filamentosas son las secuencias codificantes del péptido señal obtenidas de los genes para amilasa neutra de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, celulasa de *Humicola insolens*, endoglucanasa V de *Humicola insolens*, lipasa de *Humicola lanuginosa*, y proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*.
- 35 [0117] Péptidos señal útiles para células huésped de levadura son obtenidos de los genes para factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* e invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otras secuencias codificantes del péptido señal útiles son descritas por Romanos et al., 1992, supra.
- 40 [0118] La secuencia de control también puede ser una secuencia codificante del propéptido que codifica un propéptido posicionado en el N-término de un polipéptido. El polipéptido resultante es conocido como una proenzima o propolipéptido (o un zimógeno en algunos casos). Un propolipéptido es inactivo generalmente y se puede convertir en un polipéptido activo por escisión catalítica o autocatalítica del propéptido desde el propolipéptido. La secuencia codificante del propéptido se puede obtener de los genes para proteasa alcalina de *Bacillus subtilis* (*aprE*), proteasa neutra de *Bacillus subtilis* (*nprT*), lacasa de *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836), proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, y factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*.
- 45 [0119] Donde ambas secuencias del péptido señal y del propéptido están presentes, la secuencia del propéptido está situada junto al N-término de un polipéptido y la secuencia del péptido señal está situada junto al N-término de la secuencia del propéptido.
- 50 [0120] También puede ser deseable añadir secuencias reguladoras que regulan la expresión del polipéptido con respecto al crecimiento de la célula huésped. Ejemplos de sistemas reguladores son aquellos que hacen activar o desactivar la expresión del gen en respuesta a una sustancia química o estímulo físico, con la presencia de un compuesto regulador. Sistemas reguladores en sistemas procarióticos incluyen los sistemas del operador *lac*, *tac*, y *trp*. En la levadura, el sistema ADH2 o sistema GAL1 puede ser utilizado. En hongos filamentosos, el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger*, promotor de TAKA alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae*, y promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae* pueden ser utilizados. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son aquellas que permiten la amplificación génica. En sistemas eucarióticos, estas secuencias reguladoras incluyen el gen de dihidrofolato reductasa que se amplifica en presencia de metotrexato, y los genes de metalotioneína que se amplifican con metales pesados. En estos casos, el polinucleótido que codifica el polipéptido sería operativamente enlazado con la secuencia reguladora.
- 55 [0121] También puede ser deseable añadir secuencias reguladoras que regulan la expresión del polipéptido con respecto al crecimiento de la célula huésped. Ejemplos de sistemas reguladores son aquellos que hacen activar o desactivar la expresión del gen en respuesta a una sustancia química o estímulo físico, con la presencia de un compuesto regulador. Sistemas reguladores en sistemas procarióticos incluyen los sistemas del operador *lac*, *tac*, y *trp*. En la levadura, el sistema ADH2 o sistema GAL1 puede ser utilizado. En hongos filamentosos, el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger*, promotor de TAKA alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae*, y promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae* pueden ser utilizados. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son aquellas que permiten la amplificación génica. En sistemas eucarióticos, estas secuencias reguladoras incluyen el gen de dihidrofolato reductasa que se amplifica en presencia de metotrexato, y los genes de metalotioneína que se amplifican con metales pesados. En estos casos, el polinucleótido que codifica el polipéptido sería operativamente enlazado con la secuencia reguladora.
- 60 [0122] También puede ser deseable añadir secuencias reguladoras que regulan la expresión del polipéptido con respecto al crecimiento de la célula huésped. Ejemplos de sistemas reguladores son aquellos que hacen activar o desactivar la expresión del gen en respuesta a una sustancia química o estímulo físico, con la presencia de un compuesto regulador. Sistemas reguladores en sistemas procarióticos incluyen los sistemas del operador *lac*, *tac*, y *trp*. En la levadura, el sistema ADH2 o sistema GAL1 puede ser utilizado. En hongos filamentosos, el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger*, promotor de TAKA alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae*, y promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae* pueden ser utilizados. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son aquellas que permiten la amplificación génica. En sistemas eucarióticos, estas secuencias reguladoras incluyen el gen de dihidrofolato reductasa que se amplifica en presencia de metotrexato, y los genes de metalotioneína que se amplifican con metales pesados. En estos casos, el polinucleótido que codifica el polipéptido sería operativamente enlazado con la secuencia reguladora.
- 65 [0123] También puede ser deseable añadir secuencias reguladoras que regulan la expresión del polipéptido con respecto al crecimiento de la célula huésped. Ejemplos de sistemas reguladores son aquellos que hacen activar o desactivar la expresión del gen en respuesta a una sustancia química o estímulo físico, con la presencia de un compuesto regulador. Sistemas reguladores en sistemas procarióticos incluyen los sistemas del operador *lac*, *tac*, y *trp*. En la levadura, el sistema ADH2 o sistema GAL1 puede ser utilizado. En hongos filamentosos, el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger*, promotor de TAKA alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae*, y promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae* pueden ser utilizados. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son aquellas que permiten la amplificación génica. En sistemas eucarióticos, estas secuencias reguladoras incluyen el gen de dihidrofolato reductasa que se amplifica en presencia de metotrexato, y los genes de metalotioneína que se amplifican con metales pesados. En estos casos, el polinucleótido que codifica el polipéptido sería operativamente enlazado con la secuencia reguladora.

Vectores de expresión

- 5 [0121] La presente invención también se refiere a vectores de expresión recombinantes que comprenden un polinucleótido de la presente invención, un promotor, y señales de parada transcripcional y traduccional. Las varias secuencias de nucleótidos y de control se pueden unir entre sí para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o sustitución del polinucleótido que codifica el polipéptido en tales sitios. Alternativamente, el polinucleótido se puede expresar por la inserción del polinucleótido o un constructo de ácidos nucleicos que comprende el polinucleótido en un vector apropiado para la expresión. En la creación del vector de expresión, la secuencia codificante se localiza en el vector de modo que la secuencia codificante es operativamente enlazada con las secuencias de control apropiadas para la expresión.
- 10 [0122] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o virus) que puede ser convenientemente sometido a procedimientos de ADN recombinante y puede provocar la expresión del polinucleótido. La elección del vector típicamente dependerá de la compatibilidad del vector con la célula huésped en la que se debe introducir el vector. El vector puede ser un plásmido circular lineal o cerrado.
- 15 [0123] El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma, o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula huésped, se integra en el genoma y se replica con el(los) cromosoma(s) en el(los) que se ha integrado. Además, un vector único o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ADN total para ser introducido en el genoma de la célula huésped, o un transposón, puede(n) ser utilizado(s).
- 20 [0124] El vector contiene preferiblemente uno o más marcadores seleccionables que permiten la selección fácil de células transformadas, transfectadas, transducidas, o similar. Un marcador seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia biocida o vírica, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos, y similares.
- 25 [0125] Ejemplos de marcadores seleccionables bacterianos son genes *dal* de *Bacillus licheniformis* o *Bacillus subtilis*, o marcadores que confieren resistencia antibiótica tal como resistencia a la ampicilina, cloranfenicol, canamicina, neomicina, espectinomicina, o tetraciclina. Marcadores adecuados para células huésped de levadura incluyen, pero de forma no limitativa, ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1, y URA3. Marcadores seleccionables para usar en una célula huésped fúngica filamentosa incluyen, pero de forma no limitativa, *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina-carbamoiltransferasa), *bar* (fosfonitricina acetiltransferasa), *hph* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrato reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato-descarboxilasa), *sC* (sulfato adeniltransferasa), y *trpC* (antranilato sintasa), al igual que equivalentes de los mismos. Preferido para usar en una célula de *Aspergillus* son genes *amdS* y *pyrG* de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y un gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*.
- 30 [0126] El vector contiene preferiblemente un(os) elemento(s) que permite(n) la integración del vector en el genoma de la célula huésped o replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.
- 35 [0127] Para integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede depender de la secuencia del polinucleótido que codifica el polinucleótido o cualquier otro elemento del vector para integración en el genoma por recombinación homóloga o no homóloga. Alternativamente, el vector puede contener polinucleótidos adicionales para dirigir la integración por recombinación homóloga en el genoma de la célula huésped en una(s) ubicación(es) precisa(s) en el(los) cromosoma(s). Para aumentar la probabilidad de integración en una ubicación precisa, los elementos integracionales deberían contener un suficiente número de ácidos nucleicos, tal como 100 a 10,000 pares de bases, 400 a 10.000 pares de bases, y 800 a 10,000 pares de bases, que tienen un alto grado de identidad de secuencias a la secuencia objetivo correspondiente para mejorar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos integracionales pueden ser cualquier secuencia que es homóloga a la secuencia objetivo en el genoma de la célula huésped. Además, los elementos integracionales pueden ser polinucleótidos codificantes o no codificantes. Por otro lado, el vector se puede integrar en el genoma de la célula huésped por recombinación no homóloga.
- 40 [0128] Para la replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación permitiendo al vector replicarse autónomamente en la célula huésped en cuestión. El origen de replicación puede ser cualquier replicador de plásmido que media la replicación autónoma que funciona en una célula. El término "origen de replicación" o "replicador plásmido" significa un polinucleótido que permite que un plásmido o vector se replique *in vivo*.
- 45 [0129] El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma, o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula huésped, se integra en el genoma y se replica con el(los) cromosoma(s) en el(los) que se ha integrado. Además, un vector único o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ADN total para ser introducido en el genoma de la célula huésped, o un transposón, puede(n) ser utilizado(s).
- 50 [0130] El vector contiene preferiblemente uno o más marcadores seleccionables que permiten la selección fácil de células transformadas, transfectadas, transducidas, o similar. Un marcador seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia biocida o vírica, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos, y similares.
- 55 [0131] Ejemplos de marcadores seleccionables bacterianos son genes *dal* de *Bacillus licheniformis* o *Bacillus subtilis*, o marcadores que confieren resistencia antibiótica tal como resistencia a la ampicilina, cloranfenicol, canamicina, neomicina, espectinomicina, o tetraciclina. Marcadores adecuados para células huésped de levadura incluyen, pero de forma no limitativa, ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1, y URA3. Marcadores seleccionables para usar en una célula huésped fúngica filamentosa incluyen, pero de forma no limitativa, *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina-carbamoiltransferasa), *bar* (fosfonitricina acetiltransferasa), *hph* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrato reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato-descarboxilasa), *sC* (sulfato adeniltransferasa), y *trpC* (antranilato sintasa), al igual que equivalentes de los mismos. Preferido para usar en una célula de *Aspergillus* son genes *amdS* y *pyrG* de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y un gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*.
- 60 [0132] El vector contiene preferiblemente un(os) elemento(s) que permite(n) la integración del vector en el genoma de la célula huésped o replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.
- 65 [0133] Para integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede depender de la secuencia del polinucleótido que codifica el polinucleótido o cualquier otro elemento del vector para integración en el genoma por recombinación homóloga o no homóloga. Alternativamente, el vector puede contener polinucleótidos adicionales para dirigir la integración por recombinación homóloga en el genoma de la célula huésped en una(s) ubicación(es) precisa(s) en el(los) cromosoma(s). Para aumentar la probabilidad de integración en una ubicación precisa, los elementos integracionales deberían contener un suficiente número de ácidos nucleicos, tal como 100 a 10,000 pares de bases, 400 a 10.000 pares de bases, y 800 a 10,000 pares de bases, que tienen un alto grado de identidad de secuencias a la secuencia objetivo correspondiente para mejorar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos integracionales pueden ser cualquier secuencia que es homóloga a la secuencia objetivo en el genoma de la célula huésped. Además, los elementos integracionales pueden ser polinucleótidos codificantes o no codificantes. Por otro lado, el vector se puede integrar en el genoma de la célula huésped por recombinación no homóloga.

[0129] Ejemplos de orígenes bacterianos de replicación son los orígenes de replicación de los plásmidos pBR322; pUC19; pACYC177, y pACYC184 que permiten la replicación en *E. Coli*, y pUB110, pE194, pTA1060, y pAMB1 que permite la replicación en *Bacillus*.

5 [0130] Ejemplos de orígenes de replicación para usar en una célula huésped de levadura son el origen de 2 micras de replicación, ARS1, ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3, y la combinación de ARS4 y CEN6.

[0131] Ejemplos de orígenes de replicación útiles en una célula fúngica filamentosa son AMA1 y ANS1 (Gems et al., 1991, Gene 98: 61-67; Cullen et al., 1987, Nucleic Acids Res. 15: 9163-9175; WO 00/24883).
10 Aislamiento del gen AMA1 y construcción de plásmidos o vectores que comprenden el gen se pueden realizar según los métodos descritos en WO 00/24883.

[0132] Más de una copia de un polinucleótido de la presente invención se puede insertar en una célula huésped para aumentar la producción de un polipéptido. Un aumento en el número de copias del polinucleótido puede ser obtenido por la integración de al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped o incluyendo un gen marcador seleccionable amplificable con el polinucleótido donde células que contienen copias amplificadas del gen marcador seleccionable, y por tanto copias adicionales del polinucleótido, se pueden seleccionar por el cultivo de las células en presencia del agente seleccionable apropiado.
15

[0133] Los procedimientos usados para enlazar los elementos anteriormente descritos para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención se conocen por un experto en la materia (ver, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, supra).
20

25 **Células huésped**

[0134] La presente invención también se refiere a células huésped recombinantes, que comprenden un polinucleótido de la presente invención operativamente enlazado a una o más secuencias de control que dirigen la producción de un polipéptido de la presente invención. Una construcción o vector que comprenden un polinucleótido se introduce en una célula huésped de modo que la construcción o vector semantenienen como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico que se duplica como se describe anteriormente. El término "célula huésped" abarca cualquier progenie de una célula madre que no es idéntica a la célula madre debido a mutaciones que ocurren durante la replicación. La elección de una célula huésped en gran parte dependerá del gen que codifica el polipéptido y su fuente.
30

[0135] La célula huésped puede ser cualquier célula útil en la producción recombinante de un polipéptido de la presente invención, por ejemplo, un procarionta o un eucarionta.
35

[0136] La célula huésped procariótica puede ser cualquier bacteria gram-positiva o gram-negativa. Bacterias gram-positivas incluyen, pero de forma no limitativa, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, y *Streptomyces*. Bacterias gram-negativas incluyen, pero de forma no limitativa, *Campylobacter*, *E. Coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Helicobacter*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, y *Ureaplasma*.
40

[0137] La célula huésped bacteriana puede ser cualquier célula de *Bacillus* incluyendo, pero no limitado a, células de *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus*, *lentus* *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, y *Bacillus thuringiensis*.
45

[0138] La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptococcus* incluyendo, pero no limitado a, células de *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis*, y *Streptococcus equi* subesp. *Zooepidemicus*.
50

[0139] La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptomyces* incluyendo, pero no limitado a, células de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus*, y *Streptomyces lividans*.
55

[0140] La introducción de ADN en una célula de *Bacillus* se puede efectuar por transformación de protoplastos (ver, por ejemplo, Chang y Cohen, 1979, Mol. Gen. Genet. 168: 111-115), transformación celular competente (ver, por ejemplo, Young y Spizizen, 1961, J. Bacteriol. 81: 823-829, o Dubnau y Davidoff-Abelson, 1971, J. Mol. Biol. 56: 209-221), electroporación (véase, por ejemplo, Shigekawa and Dower, 1988, Biotechniques 6: 742-751), o conjugación (véase, por ejemplo, Koehler and Thorne, 1987, J. Bacteriol. 169: 5271-5278). La introducción de ADN en una célula de *E. coli* se puede efectuar por transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166: 557-580) o electroporación (véase, por ejemplo, Dower et al., 1988, Nucleic Acids Res. 16: 6127-6145). La introducción de ADN en una célula de *Streptomyces* se puede efectuar por transformación de protoplastos, electroporación (véase, por ejemplo,
60
65

Gong et al., 2004, Folia Microbiol. (Praha) 49: 399-405), conjugación (véase, por ejemplo, Mazodier et al., 1989, J. Bacteriol. 171: 3583-3585), o transducción (véase, por ejemplo, Burke et al., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 6289-6294). La introducción de ADN en una célula de *Pseudomonas* se puede efectuar por electroporación (véase, por ejemplo, Choi et al., 2006, J. Microbiol. Methods 64: 391-397) o conjugación (véase, por ejemplo, Pinedo y Smets, 2005, Appl. Environ. Microbiol. 71: 51-57). La introducción de ADN en una célula de *Streptococcus* se puede efectuar por competencia natural (véase, por ejemplo, Perry y Kuramitsu, 1981, Infect. Immun. 32: 1295-1297), transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, Catt y Jollick, 1991, Microbios 68: 189-207), electroporación (véase por ejemplo, Buckley et al., 1999, Appl. Environ. Microbiol. 65: 3800-3804), o conjugación (véase, por ejemplo, Clewell, 1981, Microbiol. Rev. 45: 409-436). Sin embargo, cualquier método conocido en la técnica para la introducción de ADN en una célula huésped puede ser usado.

[0141] La célula huésped también puede ser un eucariota, tal como un mamífero, insecto, planta, o célula fúngica.

[0142] La célula huésped puede ser una célula fúngica. "Hongos" como se utilizan en este caso incluye el filo Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, y Zygomycota al igual que Oomycota y todos los hongos mitospóricos (como definido por Hawksworth et al., en, Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8ª edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK).

[0143] La célula huésped fúngica puede ser una célula de levadura. "Levadura" como se utiliza en este caso incluye levadura ascoesporógena (Endomycetales), levadura basidioesporogénea, y levadura de los Fungi Imperfecti (Blastomycetys). Ya que la clasificación de levadura puede cambiar en el futuro, para los fines de esta invención, levadura debe ser definida como se describe en la Biology and Activities of Yeast (Skinner, Passmore, and Davenport, editors, Soc. App. Bacteriol. Serie de simposio nº 9, 1980).

[0144] La célula huésped de levadura puede ser una célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o *Yarrowia*, tal como una célula de *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, *Saccharomyces oviformis*, o *Yarrowia lipolytica*.

[0145] La célula huésped fúngica puede ser una célula fúngica filamentosa. "Hongos filamentosos" incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycota y Oomycota (como se define por Hawksworth et al., 1995, supra). Los hongos filamentosos están generalmente caracterizados por una pared micelial compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano, y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo es por alargamiento hifal y el catabolismo de carbono es estrictamente aeróbico. En cambio, el crecimiento vegetativo por levaduras tal como *Saccharomyces cerevisiae* es por el injerto de un talo unicelular y el catabolismo de carbono puede ser fermentativo.

[0146] La célula huésped fúngica filamentosa puede ser una célula de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trametes*, o *Trichoderma*.

[0147] Por ejemplo, la célula huésped fúngica filamentosa puede ser una célula de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis pannocinta*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Coprinus cinereus*, *Coriolus hirsutus*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochromum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus eryngii*, *Thielavia terrestris*, *Trametes villosa*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, o *Trichoderma viride*.

[0148] Células fúngicas se pueden transformar por un proceso que implica la formación de protoplastos, transformación de los protoplastos, y regeneración de la pared celular en cierto modo conocido *per se*. Procedimientos adecuados para transformación de *Aspergillus* y células huésped de *Trichoderma* están descritos en EP 238023, Yelton et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1470-1474, y Christensen et al.,

1988, Bio/Technology 6: 1419-1422. Métodos adecuados para transformar especies de *Fusarium* están descritos por Malardier et al., 1989, Gene 78: 147-156, y WO 96/00787. Levadura se puede transformar utilizando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, en Abelson, J.N. y Simon, M.I., editores, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Volumen 194, págs. 182-187, Academic Press, Inc., New York; Ito et al., 1983, J. Bacteriol. 153: 163; e Hinnen et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1920.

Métodos de producción

10 [0149] La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención, que comprende (a) cultivo de una célula huésped recombinante de la presente invención bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.

15 [0150] Las células huésped se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción del polipéptido usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula se puede cultivar por cultivo en matraz de agitación, o fermentación a escala pequeña o a gran escala (incluyendo fermentaciones continuas, en lote, lote alimentado, o de estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales realizados en un medio adecuado y bajo condiciones que permiten al polipéptido expresarse y/o aislarse. El cultivo tiene lugar en un medio nutritivo adecuado comprendiendo fuentes de nitrógeno y carbono y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según composiciones publicadas (por ejemplo, en catálogos de la American Type Culture Collection). Si el polipéptido se segrega en el medio nutritivo, el polipéptido se puede recuperar directamente del medio. Si el polipéptido no es segregado, se puede recuperar de lisatos celulares.

25 [0151] El polipéptido se puede detectar utilizando métodos conocidos en la técnica que son específicos para los polipéptidos por ejemplo el ensayo de manchas de lisozima como se describe a continuación. Estos métodos de detección incluyen, pero de forma no limitativa, el uso de anticuerpos específicos, formación de un producto enzimático, o desaparición de un sustrato enzimático. Por ejemplo, un ensayo enzimático se puede utilizar para determinar la actividad del polipéptido.

30 [0152] El polipéptido se puede recuperar utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido se puede recuperar del medio nutritivo por procedimientos convencionales incluyendo, pero no limitados a, colección, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación, o precipitación.

35 [0153] El polipéptido se puede purificar por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero no limitados a, cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, cromatoenfoco hidrofóbico, y exclusión de tamaños), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectroenfoco preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación de sulfato amónico), SDS-PAGE, o extracción (véase, por ejemplo, Protein Purification, Janson and Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989) para obtener polipéptidos sustancialmente puros.

40 [0154] En un aspecto alternativo, el polipéptido no es recuperado, sino que una célula huésped de la presente invención que expresa el polipéptido se usa como una fuente del polipéptido.

Plantas

45 [0155] La presente invención también se refiere a plantas aisladas, por ejemplo, una planta transgénica, parte de la planta, o célula vegetal, que comprende un polinucleótido de la presente invención para expresar y producir un polipéptido o dominio en cantidades recuperables. El polipéptido o dominio se puede recuperar de la planta o parte de la planta. Alternativamente, la planta o parte de la planta con el polipéptido o dominio se puede utilizar como tal para mejorar la calidad de un alimento o pienso, por ejemplo, mejora del valor nutricional, palatabilidad, y propiedades reológicas, o para destruir un factor antinutritivo.

55 [0156] La planta transgénica puede ser dicotiledónea (un dicot) o monocotiledónea (un monocot). Ejemplos de plantas monocotiledóneas son hierbas, tal como poa de prados (pasto azul, *Poa*), hierba forrajera tal como Festuca, *Lolium*, césped templado, tal como *Agrostis*, y cereales, por ejemplo, trigo, avena, centeno, cebada, arroz, sorgo, y maíz (trigo)

60 [0157] Ejemplos de plantas dicotiledóneas son tabaco, legumbres, tales como altramuces, patata, remolacha azucarera, guisante, judía y soja, y plantas crucíferas (familia Brassicaceae), tal como coliflor, semilla de colza, y el organismo modelo cercanamente relacionado *Arabidopsis thaliana*.

65 [0158] Ejemplos de partes de la planta son tallo, callo, hojas, raíz, frutas, semillas, y tubérculos al igual que los tejidos individuales que comprenden estas partes, por ejemplo, epidermis, mesofilo, parénquima, tejidos vasculares, meristemas. Compartimentos de células vegetales específicos, tales como cloroplastos,

apoplastos, mitocondria, vacuolas, peroxisomas y citoplasma están también considerados una parte de la planta. Además, cualquier célula vegetal, sea cual sea el origen del tejido, se considera para una parte de la planta. Asimismo, partes de la planta tales como tejidos específicos y células aisladas para facilitar la utilización de la invención son también consideradas partes de la planta, por ejemplo, embriones, endospermas, aleurona y revestimientos de semilla.

[0159] Incluido también dentro del campo de la presente invención está la progenie de tales plantas, partes de la planta, y células vegetales.

[0160] La planta transgénica o célula vegetal que expresa el polipéptido o dominio se puede construir conforme a métodos conocidos en la técnica. En resumen, la planta o célula vegetal se construye por la incorporación de uno o más constructos de expresión que codifican el polipéptido o dominio en el genoma del huésped de planta o genoma de cloroplasto y que propagan la planta modificada resultante o célula vegetal en una planta transgénica o célula vegetal.

[0161] El constructo de expresión es convenientemente un constructo de ácidos nucleicos que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido o dominio operativamente enlazado con secuencias reguladoras apropiadas requeridas para la expresión del polinucleótido en la planta o parte de la planta de elección. Además, el constructo de expresión puede comprender una etiqueta seleccionable útil para la identificación de células vegetales en las que el constructo de expresión ha sido integrado y secuencias de ADN necesarias para la introducción del constructo en la planta en cuestión (esto último depende del método de introducción de ADN que se utilice).

[0162] La elección de secuencias reguladoras, tales como secuencias del promotor y del terminador y opcionalmente secuencias señal o de tránsito, se determina, por ejemplo, basándose en cuándo, dónde, y cómo el polipéptido o dominio se desea expresar. Por ejemplo, la expresión del gen que codifica un polipéptido o dominio puede ser constitutiva o inducible, o puede ser específica del desarrollo, fase o tejido, y el producto génico puede ser dirigido a un tejido específico o parte de la planta tal como semillas u hojas. Secuencias reguladoras son, por ejemplo, descritas por Tague et al., 1988, *Plant Physiology* 86: 506.

[0163] Para la expresión constitutiva, el 35S-CaMV, la ubiquitina-1 de maíz, o el promotor de actina de arroz 1 se pueden utilizar (Franck et al., 1980, *Cell* 21: 285-294; Christensen et al., 1992, *Plant Mol. Biol.* 18: 675-689; Zhang et al., 1991, *Plant Cell* 3: 1155-1165). Promotores específicos de un órgano pueden ser, por ejemplo, un promotor de tejidos sumidero de almacenamiento tales como semillas, tubérculos de patata, y frutas (Edwards y Coruzzi, 1990, *Ann. Rev. Genet.* 24: 275-303), o de tejidos sumidero metabólicos tales como meristemas (Ito et al., 1994, *Plant Mol. Biol.* 24: 863-878), un promotor específico de semilla como la glutelina, prolamina, globulina, o promotor de albúmina de arroz (Wu et al., 1998, *Plant Cell Physiol.* 39: 885-889), un promotor de *Vicia faba* de la legúmina B4 y el gen de proteína de semilla desconocida de *Vicia faba* (Conrad et al., 1998, *J. Plant Physiol.* 152: 708-711), un promotor de una proteína corporal del aceite de semillas (Chen et al., 1998, *Physiol de célula vegetal.* 39: 935-941), el promotor *napA* de la proteína de almacenamiento de *Brassica napus*, o cualquier otro promotor específico de semilla conocido en la técnica, por ejemplo, como se describe en WO 91/14772. Además, el promotor puede ser un promotor específico de hoja tal como el promotor *rbcs* de arroz o tomate (Kyojuka et al., 1993, *Plant Physiol.* 102: 991-1000), el promotor del gen de adenina metiltransferasa del virus de *Chlorella* (Mitra y Higgins, 1994, *Plant Mol. Biol.* 26: 85-93), el promotor del gen *aldP* de arroz (Kagaya et al., 1995, *Mol. Gen. Genet.* 248: 668-674), o un promotor inducible de herida como el promotor *pin2* de patata (Xu et al., 1993, *Plant Mol. Biol.* 22: 573-588). Asimismo, el promotor se puede inducir por tratamientos abióticos tal como temperatura, sequía, o alteraciones en la salinidad o inducidas por sustancias aplicadas exógenamente que activan el promotor, por ejemplo, etanol, estrógenos, hormonas vegetales tal como etileno, ácido abscísico, y ácido giberélico, y metales pesados.

[0164] Un elemento intensificador del promotor también se puede usar para conseguir expresión más alta de un polipéptido o dominio en la planta. Por ejemplo, el elemento intensificador del promotor puede ser un intrón que es colocado entre el promotor y el polinucleótido que codifica un polipéptido o dominio. Por ejemplo, Xu et al., 1993, *supra*, revelan el uso del primer intrón del gen de actina de arroz 1 para mejorar la expresión.

[0165] El gen marcador seleccionable y cualquiera de las otras partes del constructo de expresión se pueden elegir de aquellos disponibles en la técnica.

[0166] El constructo de ácidos nucleicos se incorpora en el genoma de la planta según técnicas convencionales conocidas en la técnica, incluyendo transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación mediada por virus, microinyección, bombardeo de partículas, transformación biolística, y electroporación (Gasser et al., 1990, *Science* 244: 1293; Potrykus, 1990, *Bio/Technology* 8: 535; Shimamoto et al., 1989, *Nature* 338: 274).

[0167] La transferencia de genes mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es un método para generar dicotiledóneas transgénicas (para una revisión, véase Hooykas y Schilperoort, 1992, *Plant Mol. Biol.* 19: 15-38) y para la transformación de monocotiledóneas, aunque otros métodos de transformación se pueden utilizar para estas plantas. Un método para generar monocotiledóneas transgénicas es el bombardeo de partículas (partículas de oro microscópico o de tungsteno recubiertas con el ADN transformante) de callos embriogénicos o embriones en desarrollo (Christou, 1992, *Plant J.* 2: 275-281; Shimamoto, 1994, *Curr. Opin. Biotechnol.* 5: 158-162; Vasil et al., 1992, *Bio/Technology* 10: 667-674). Un método alternativo para transformación de monocotiledóneas se basa en la transformación de protoplastos como se describe por Omirulleh et al., 1993, *Plant Mol. Biol.* 21: 415-428. Métodos de transformación adicionales incluyen aquellas descritas en la patente estadounidense Nos. 6,395,966 y 7,151,204.

[0168] Después de la transformación, los transformantes que han incorporado el constructo de expresión se seleccionan y regeneran en plantas enteras según métodos bien conocidos en la técnica. Frecuentemente el procedimiento de transformación se diseña para la eliminación selectiva de genes de selección bien durante la regeneración o en las siguientes generaciones usando, por ejemplo, cotransformación con dos constructos de T-ADN separados o escisión específica del sitio del gen de selección por una recombinasa específica.

[0169] Además de la transformación directa de un genotipo de planta particular con una construcción de la presente invención, las plantas transgénicas pueden ser hechas cruzando una planta que tiene la construcción con una segunda planta que carece de la construcción. Por ejemplo, una construcción que codifica un polipéptido o dominio se puede introducir en una variedad de plantas particulares por el cruce, sin la necesidad de siempre transformar directamente una planta de esta variedad dada. Por lo tanto, la presente invención abarca no solo una planta directamente regenerada de células que han sido transformadas conforme a la presente invención, sino también la progenie de tales plantas. Como se utiliza en este caso, progenie puede referirse a la progenie de cualquier generación de una planta progenitora preparada conforme a la presente invención. Tal progenie puede incluir un constructo de ADN preparado conforme a la presente invención. El cruce resulta en la introducción de un transgen en una línea vegetal por polinización cruzada de una línea precursora con una línea vegetal donadora. Ejemplos no limitativos de tales pasos se describen en la patente estadounidense nº 7,151,204.

[0170] Las plantas se pueden generar a través de un proceso de conversión de retrocruce. Por ejemplo, las plantas incluyen plantas referidas como un genotipo, línea, engendro, o híbrido convertido retrocruzado.

[0171] Marcadores genéticos se pueden utilizar para asistir en la introgresión de uno o más transgenes de la invención de un antecedente genético en otro. La selección asistida por marcador ofrece la ventaja con respecto al cultivo convencional de que se puede usar para evitar errores provocados por variaciones fenotípicas. Además, marcadores genéticos pueden proporcionar datos con respecto al grado relativo de germoplasma de élite en la progenie individual de un cruce particular. Por ejemplo, cuando una planta con una característica deseada de lo contrario tiene un contexto genético no deseable agrónomicamente se cruza con un progenitor de élite, los marcadores genéticos se pueden utilizar para seleccionar la progenie que no solo posee la característica de interés, sino que también tiene una proporción relativamente grande del germoplasma deseado. De esta manera, el número de generaciones requerido para la introgresión de uno o más rasgos en un contexto genético particular es minimizado.

[0172] La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido o dominio de la presente invención que comprende (a) cultivo de una planta transgénica o una célula vegetal que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido o dominio bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido o dominio; y (b) recuperación del polipéptido o dominio.

Usos

[0173] Ejemplos de usos preferidos de la lisozima o sus composiciones de la presente invención se dan a continuación. La dosificación de la lisozima y otras condiciones bajo las cuales se usa la lisozima se pueden determinar basándose en métodos conocidos en la técnica.

[0174] Los polipéptidos de la invención son útiles típicamente en cualquier locus sujeto a contaminación por bacterias, hongos, levadura o algas. Típicamente, los loci están en sistemas acuosos tales como sistemas de agua de refrigeración, agua de enjuague de lavandería, sistemas de aceite tales como aceites de corte, lubricantes, campos de aceite y similares, donde se desea matar los microorganismos o al menos controlar su crecimiento. Sin embargo, la presente invención también se puede usar en todas las aplicaciones para las que las composiciones de lisozimas conocidas son útiles, tal como protección de madera, látex, adhesivo, pegamento, papel, cartón, textil cuero, plásticos, calafateo, y piensos.

[0175] Una lisozima, o una composición de la misma, de la presente invención se puede utilizar en diferentes aplicaciones para degradar un material que comprende un peptidoglicano o una quitodextrina tratando el material con la lisozima o composición de la misma (véase por ejemplo Proctor and Cunningham, (1988)

Critical Reviews in Food Science and Nutrition 26:359-395; Carini et al. (1985) Microbiol. Alimen. Nutr. 3:299-320; Hughey y Johnson (1987) Appl. Environ. Microbiol. 53:2165-2170; Cunningham et al. (1991) World's Poultry Science Journal 47:141-163). Usos de lisozimas de la invención para limpieza y/o detergentes

5 [0176] Una lisozima de la presente invención es preferiblemente incorporada en y/o usada junto con composiciones detergentes como se describe abajo. Cuando el lavado se realiza reiteradamente a temperaturas inferiores a 60°C hay un riesgo aumentado de mal olor en la lavadora (lavado de la ropa al igual que lavavajillas) y en los tejidos o artículos lavados a máquina. Este mal olor es posible que sea provocado por organismos microbianos tales como bacterias, hongos, algas u otros organismos unicelulares que crecen
10 en la lavadora.

[0177] Además, la invención se refiere a un procedimiento para el lavado de tejidos que comprende tratar los tejidos con una solución de lavado con una composición de detergente y una lisozima o una composición de lisozima de la invención. El tratamiento para el lavado de ropa puede por ejemplo efectuarse en un proceso de lavado a máquina o en un proceso de lavado a mano. La solución de lavado puede por ejemplo ser una solución de lavado acuosa que contiene la composición de detergente y con un pH entre 3 y 12.

[0178] Los tejidos sometidos a los métodos de la presente invención pueden ser colada lavable convencional, por ejemplo colada doméstica. Preferiblemente, la parte principal de la colada son prendas y tejidos, incluyendo de punto, tejidos, telas vaqueras, de hilo, y de rizo, hechos de algodón, de mezcla de algodón o de celulosa natural o artificial (por ejemplo, originados de pulpa de madera) o mezclas de los mismos. Ejemplos de mezclas son las mezclas de algodón o rayón/viscosa con uno o más material acompañante tal como lana, fibras sintéticas (por ejemplo, fibras de poliamida, fibras acrílicas, fibras de poliéster, fibras de alcohol polivinílico, fibras de cloruro de polivinilo, fibras de poliuretano, fibras de poliurea, fibras de aramida),
20 y fibras con celulosa (por ejemplo, rayón/viscosa, ramio, lino, yute, fibras de acetato de celulosa, liocel).

[0179] La presente invención proporciona un método para reducir la contaminación microbiana en una superficie, tal como una prenda textil o superficie dura tal como metal, plástico o partes de caucho en una lavadora o lavavajillas, azulejos para cuarto de baño, suelos, tableros de mesa, drenajes, fregaderos y lavabo, tratando la superficie contaminada de forma microbiana con una lisozima o composición de lisozima de la presente invención. Tal tratamiento está también previsto para reducir el mal olor en tejidos y superficies duras que contienen contaminación microbiana.

[0180] La reducción de contaminación microbiana se puede evaluar en diferentes vías, por ejemplo, dejando una evaluación de panel si el olor ha sido disminuido, alternativamente una muestra puede tomarse desde la superficie y cultivarse para valorar si el recuento microbiano ha sido reducido como resultado del tratamiento en comparación con un tratamiento sin lisozima. Usos de lisozimas de la invención en pienso para animales

[0181] Una lisozima de la invención también se puede usar en pienso para animales. En una forma de realización, la presente invención proporciona un método para preparar una composición de pienso para animales que comprende añadir una lisozima de la presente invención a uno o más ingredientes de pienso para animales.

[0182] Una lisozima de la presente invención puede por ejemplo ser usada estabilizar la microflora sana de animales, en particular ganado tal como, pero no limitado a, oveja, cabras, ganado (incluyendo, pero no limitado a, ganado vacuno, vacas, y terneros jóvenes), ciervo, cerdos o puercos (incluyendo, pero no limitados a, lechones, cerdos en crecimiento, y cerdas), aves (incluyendo, pero no limitados a, ocas, pavos, patos y pollo tales como pollos para asar, polluelos y gallinas ponedoras); caballos, alces y conejos pero también en pescado (incluyendo pero no limitado a salmón, trucha, tilapia, siluro y carpas; y crustáceos (incluyendo pero no limitado a langostinos y gambas)). En una forma de realización preferida, la lisozima reemplaza antibióticos en dietas para animales. En otra forma de realización una lisozima de la presente invención se usa como un aditivo de pienso, donde éste puede proporcionar un efecto positivo en el equilibrio microbiano del tracto digestivo de pollo y de esta manera mejorar el rendimiento animal.

[0183] Una lisozima de la presente invención también se puede usar en pienso para animales como enzimas mejoradoras del pienso que mejoran la digestibilidad del pienso para aumentar la eficiencia de su utilización según WO 00/21381 y WO 04/026334.

[0184] En otra forma de realización una lisozima de la presente invención se puede utilizar como un aditivo de pienso, donde éste puede proporcionar un efecto positivo en el tracto digestivo de los animales y de esta manera mejorar el rendimiento animal de acuerdo con el aumento de peso, índice de conversión alimenticia (FCR), o salud del animal mejorada tal como índice de mortalidad disminuido. FCR se calcula como el consumo de pienso en g/animal con respecto al aumento de peso en g/animal.

65 Usos de lisozimas de la invención como agentes antimicrobianos

[0185] Una lisozima de la presente invención se puede utilizar como agentes antimicrobianos. Un aspecto de la presente invención es un método para reducir la contaminación microbiana, que comprende tratar una superficie contaminada microbiana con una lisozima de la presente invención.

5 [0186] Para valorar si una lisozima de la presente invención es capaz de actuar como un agente antimicrobiano se puede evaluar en un ensayo de turbidez. En este ensayo se evalúa si la lisozima es capaz de degradar células microbianas por ejemplo un sustrato seco de células de *Exiguobacterium undae* (aisladas a partir de un calcetín maloliente) o células de *Micrococcus luteus* disueltas en el tampón o detergente, y así reducir la densidad óptica (OD) a por ejemplo 540 nm, cuando se compara con una
10 suspensión microbiana solo tratada con tampón.

Usos de lisozimas de la invención para desinfección o como un desinfectante

15 [0187] Una lisozima de la presente invención puede ser útil como un desinfectante o usada para desinfección, por ejemplo, para el tratamiento de infecciones en el ojo o la boca, o para limpiar y desinfectar lentes de contacto, y para prevenir o eliminar biopelícula en una superficie según la patente estadounidense nº 6,777,223.

20 [0188] Una lisozima de la presente invención también se puede usar en cuidado bucal. Por ejemplo, la lisozima se puede usar sola o en combinación con otras enzimas o incluso péptidos antimicrobianos en la pasta dental u otros productos de cuidado bucal. Los polipéptidos se pueden introducir en la cavidad bucal o aplicar a un artículo que se debe introducir en la cavidad bucal. Véase por ejemplo WO 08/124764.

25 [0189] En general se contempla que los polipéptidos de la presente invención son útiles para limpiar, desinfectar o inhibir el crecimiento microbiano en cualquier superficie. Ejemplos de superficies, que pueden ventajosamente ser contactadas con los polipéptidos de la invención son las superficies de equipo de procesamiento usado por ejemplo en lecherías, plantas de procesamiento químico o farmacéutico, sistemas de saneamiento de agua, plantas de procesamiento de aceite, plantas de procesamiento de pasta de papel, plantas de tratamiento de agua, y torres de enfriamiento. Los polipéptidos de la invención deberían ser
30 usados en una cantidad, que es eficaz para limpiar, desinfectar o inhibir el crecimiento microbiano en la superficie en cuestión.

[0190] Los polipéptidos de la invención pueden adicionalmente ser usados para limpiar superficies y utensilios de cocina en las plantas de procesamiento de alimentos y en cualquier área donde se preparan o
35 sirven alimentos tales como hospitales, clínicas y restaurantes.

Usos de lisozimas de la invención en aplicaciones alimenticias

40 [0191] Una lisozima de la presente invención también se puede usar para inhibir selectivamente el crecimiento descontrolado de *Clostridium tyrobutyricum* durante la maduración de quesos, en particular aquellos hechos de cuajadas prensadas y cocinadas, por ejemplo, queso suizo, parmesano, Edam, Gouda, Cheddar, y muchos otros.

45 [0192] Una lisozima de la presente invención también se puede usar en la fabricación de vino, para controlar o inhibir la contaminación microbiana.

Usos de lisozimas de la invención como tratamientos

50 [0193] Una lisozima de la presente invención también se puede usar en tratamiento local de lesiones distróficas e inflamatorias de la piel y tejidos blandos. Véase por ejemplo Palmieri y Boraldi (1977) Arch. Sci. Med. (Torino) 134:481-485.

55 [0194] Una lisozima de la presente invención también se puede usar en el cuidado de la piel. Por ejemplo, el polipéptido se aplica a la piel de un paciente que sufre una infección de la piel, tal como acné. La lisozima también se puede usar en un vendaje de heridas, que se aplica a la piel herida, por ejemplo, para ayudar en la curación de la herida. Véase, por ejemplo, solicitud estadounidense nº 20080254079.

60 [0195] Una lisozima de la presente invención también se puede usar en lápiz de labios, bálsamo de labios, gel de labios, o brillo de labios. Por ejemplo, tales productos se pueden usar para el tratamiento de una infección localizada en el labio, por ejemplo, un herpes labial. Véase, por ejemplo, solicitud estadounidense nº 20080254079.

[0196] Una lisozima de la presente invención también se puede usar en el tratamiento de enfermedades broncopulmonares.

65

[0197] Una lisozima de la presente invención también se puede usar como enzimas digestivas o ayuda digestiva. Una lisozima de la presente invención también se puede usar para mejorar el uso de bacterias muertas/vivas como una fuente alimenticia, por ejemplo, controlando los contaminantes microbianos indeseables.

[0198] Una lisozima de la presente invención también se puede usar como un agente terapéutico en un humano u otro animal, por ejemplo, para controlar o inhibir el crecimiento excesivo bacteriano en los intestinos de un humano que sufre una enfermedad, por ejemplo, enfermedad pancreática o un paciente inmunocomprometido.

Usos de lisozimas de la invención para extraer el ADN genómico bacteriano

[0199] Una lisozima de la presente invención también se puede usar para ayudar en la extracción de ADN genómico bacteriano. Con el objetivo de ser capaz de secuenciar el ADN bacteriano, la pared celular bacteriana necesita ser descompuesta para aislar el ADN dentro de ésta. La pared celular especialmente de bacterias gram positivas puede ser difícil de descomponer.

[0200] Lisozima de clara de huevo de gallina es la enzima estándar usada para aislamiento de ADN de bacterias gram positivas y funciona hidrolizando las cadenas de peptidoglicano presentes en la pared celular así ayudando en la degradación de las paredes celulares. Sin embargo, algunas paredes celulares gram positivas no se degradan por lisozimas de clara de huevo de gallina. Por ejemplo, se recomienda que células de por ejemplo *Staphylococcus aureus* se lisan con lisostafina como se describe por Pitcher y Saunders (1989), App. Environ. Microbiol. 56(3): 782-787. Sin embargo, estos métodos no funcionan para todos los tipos de bacterias gram positivas y lisozimas nuevas así potencialmente ofreciendo acceso a genomas nuevos que no se pueden aislar con soluciones de lisozimas comerciales

Otros usos de lisozimas de la invención

[0201] Una lisozima de la presente invención también se puede usar para controlar el crecimiento microbiano en un proceso de fermentación, tal como, en la fabricación de etanol u otros productos de biomasa. Véase, por ejemplo, WO 2007/109750. Por consiguiente, la lisozima puede ser utilizada, por ejemplo, en un proceso para producir un producto de fermentación que comprende (a) licuefacción y/o sacarificación de un material de carbohidrato y (b) fermentación usando un organismo de fermentación, donde una lisozima de la presente invención se aplica al proceso de fermentación antes, durante y/o después de las concentraciones de fermentación suficientes para matar y/o inhibir el crecimiento de células bacterianas.

[0202] Una lisozima de la presente invención también se puede usar para controlar el crecimiento microbiano en una piscifactoría o granja de langostinos.

[0203] Otros usos incluyen conservación de alimentos, bebidas, cosméticos tales como lociones, cremas, geles, pomadas, jabones, champús, acondicionadores, antitranspirante, desodorantes, formulaciones enzimáticas, o ingredientes alimenticios.

Composiciones

[0204] En otro aspecto ulterior, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden un polipéptido de la presente invención que tiene actividad antimicrobiana y/o de lisozima.

[0205] La composición puede comprender un polipéptido de la invención como el componente enzimático principal, por ejemplo, una composición monocomponente. Alternativamente, la composición puede comprender actividades enzimáticas múltiples, tal como una aminopeptidasa, amilasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celulasa, quitinasa, cutinasa, ciclodextrina glicosiltransferasa, desoxirribonucleasa, esterasa, alfa-galactosidasa, beta-alactosidasa, glucoamilasa, alfa-glucosidasa, beta-glucosidasa, haloperoxidasa, invertasa, lacasa, lipasa, manosidasa, oxidasa, enzima pectinolítica, peptidoglutaminasa, peroxidasa, fitasa, polifenoloxidasa, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa, o xilanasas.

[0206] Las composiciones se pueden preparar conforme a métodos conocidos en la técnica y pueden estar en forma de un líquido o una composición seca. Por ejemplo, la composición de polipéptido puede estar en forma de un granulado o un microgranulado. El polipéptido que debe ser incluido en la composición se puede estabilizar conforme a métodos conocidos en la técnica.

[0207] Ejemplos son dados a continuación de usos preferidos de las composiciones de polipéptido de la invención. La dosificación de la composición de polipéptido de la invención y otras condiciones bajo las cuales se usa la composición se pueden determinar basándose en métodos conocidos en la técnica.

Composiciones de pienso para animales

- 5 [0208] La presente invención está también dirigida a métodos para utilizar los polipéptidos de la presente invención que tienen actividad de lisozima en el pienso para animales, al igual que a composiciones alimenticias y aditivos alimenticios que comprenden las lisozimas de la invención.
- 10 [0209] El término animal incluye todos los animales, incluyendo seres humanos. Ejemplos de animales son no rumiantes, y rumiantes. Animales rumiantes incluyen, por ejemplo, animales tales como oveja, cabras, y ganado, por ejemplo, ganado vacuno y vacas. En una forma de realización particular, el animal es un animal no rumiante. Animales no rumiantes incluyen animales monogástricos, por ejemplo cerdos o puercos (incluyendo, pero no limitados a, lechones, cerdos en crecimiento, y cerdas); aves tales como pavos, ocas, patos y pollo (incluyendo pero no limitado a pollos para asar, gallinas ponedoras); caballos (incluyendo pero no limitados a, de sangre caliente, de sangre fría y de sangre templada), terneros jóvenes; y pescado (incluyendo pero no limitados a salmón, trucha, tilapia, siluro y carpas; y crustáceos (incluyendo pero no limitado a langostinos y gambas).
- 20 [0210] El término pienso o composición de pienso significa cualquier compuesto, preparación, mezcla, o composición adecuada para, o destinada para la ingesta por un animal. En el uso según la invención la lisozima se puede alimentar al animal antes, después, o simultáneamente con la dieta. El último es preferido. Tales composiciones de lisozima pueden por supuesto estar mezcladas con otras enzimas.
- 25 [0211] La lisozima se puede añadir al pienso en cualquier forma, ser ésta como una lisozima relativamente pura o en mezcla con otros componentes previstos para la adición a pienso para animales, es decir en forma de aditivos de pienso, tal como las denominadas premezclas para pienso para animales. En otro aspecto la presente invención se refiere a composiciones para usar en el pienso para animales, tal como pienso para animales, y aditivos de pienso, por ejemplo, premezclas.
- 30 [0212] Aparte de la lisozima de la invención, los aditivos de pienso de la invención contienen al menos una vitamina liposoluble, y/o al menos una vitamina hidrosoluble, y/o al menos un oligoelemento, y/o al menos un macromineral.
- 35 [0213] Además, ingredientes de aditivo de pienso opcionales son agentes colorantes, por ejemplo carotenoides tal como beta-caroteno, astaxantina, y luteína; estabilizadores; aditivos de mejora de crecimiento y compuestos/aromatizantes de aroma, por ejemplo creosol, anetol, deca, undeca-y/o dodecalactonas, iononas, irona, gingerol, piperidina, propilideno ftalida, butilideno ftalida, capsaicina y/o tanina; ácidos grasos poliinsaturados (PUFA); especies generadoras de oxígeno reactivo; también, un soporte se puede utilizar que puede contener, por ejemplo, 40- 50% en peso de fibras de madera, 8-10% en peso de estearina, 4-5% en peso de polvo de cúrcuma, 4-58% en peso de polvo de romero, 22- 28% en peso de piedra caliza, 1-3% en peso de una goma, tal como goma arábiga, 5-50% en peso de azúcar y/o almidón y 5-15% en peso de agua.
- 40 [0214] Un pienso o un aditivo de pienso de la invención también puede comprender al menos otra enzima seleccionada entre fitasa (EC 3.1.3.8 o 3.1.3.26); xilanasas (EC 3.2.1.8); galactanasas (EC 3.2.1.89); alfa-galactosidasa (EC 3.2.1.22); proteasa (EC 3.4), fosfolipasa A1 (EC 3.1.1.32); fosfolipasa A2 (EC 3.1.1.4); lisofosfolipasa (EC 3.1.1.5); fosfolipasa C (3.1.4.3); fosfolipasa D (EC 3.1.4.4); amilasa tal como, por ejemplo, alfa-amilasa (EC 3.2.1.1) y/o beta-glucanasa (EC 3.2.1.4 o EC 3.2.1.6).
- 45 [0215] Ejemplos de ácidos grasos poliinsaturados son C18, C20 y C22 ácidos grasos poliinsaturados, tal como ácido araquidónico, ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentanoico y ácido gamma-linolénico.
- 50 [0216] Ejemplos de especies generadoras de oxígeno reactivo son productos químicos tal como perborato, persulfato, o percarbonato; y enzimas tales como una oxidasa, una oxigenasa o una sintetasa.
- 55 [0217] Vitaminas liposolubles e hidrosolubles, al igual que oligoelementos forman parte de una denominada premezcla destinada para adición al pienso, mientras que macrominerales son normalmente añadidos por separado al pienso. Cualquiera de estos tipos de composición, cuando se enriquecen con una proteasa de la invención, es un aditivo de pienso de la invención.
- 60 [0218] En una forma de realización particular, el aditivo de pienso de la invención se destina a estar incluido (o prescrito como teniendo que ser incluido) en dietas para animales o pienso para animales a niveles de 0,1 ppm a 1000 ppm, preferiblemente 0,5 ppm a 200 ppm y más preferiblemente 1 ppm a 100 ppm. Los niveles de dosificación anteriormente mencionados también pueden usarse para premezclas.
- 65 [0219] La composición de pienso para animales de la invención puede contener al menos una proteína vegetal, tal como aquella derivada de u originada de un vegetal, incluyendo proteínas modificadas y derivados de proteína. Proteínas vegetales se pueden derivar de fuentes de proteína vegetal, tales como

leguminosas y cereales, por ejemplo, materiales de plantas de las familias *Fabaceae* (*Leguminosae*), *Cruciferaeae*, *Chenopodiaceae*, y *Poaceae*, tal como harina de soja, harina de lupino y comida de semilla de colza. Alternativamente, la fuente de proteína vegetal es material de una o más plantas de la familia *Chenopodiaceae*, por ejemplo, remolacha, remolacha azucarera, espinaca o quinoa. Otros ejemplos de fuentes de proteína vegetal son semilla de colza, semilla de girasol, semilla de algodón, y repollo y cereales tal como cebada, trigo, centeno, avena, maíz (trigo), arroz, triticale, y sorgo.

[0220] La composición de pienso para animales de la invención también puede contener proteína animal, tal como harina de carne y hueso, harina de plumas, y/o harina de pescado, típicamente en una cantidad de 0-25%. La composición de pienso para animales de la invención también puede comprender granos de destilería con solubles (DDGS), típicamente en cantidades de 0-30%.

[0221] En otras formas de realización particulares, la composición de pienso para animales de la invención contiene 0-80% maíz; y/o 0-80% sorgo; y/o 0-70% trigo; y/o 0-70% cebada; y/o 0-30% avena; y/o 0-40% harina de soja; y/o 0-25% harina de pescado; y/o 0-25% harina de carne y hueso; y/o 0-20% suero de leche.

[0222] Dietas para animales pueden por ejemplo ser fabricadas como pienso triturado (no granulado) o pienso granulado. Típicamente, los materiales de pienso molidos se mezclan y cantidades suficientes de vitaminas esenciales y minerales se agregan según las especificaciones para las especies en cuestión. Las enzimas se pueden añadir como formulaciones enzimáticas sólidas o líquidas. Por ejemplo, para triturar una formulación sólida o líquida enzimática se puede adicionar antes o durante la etapa de mezcla de ingredientes. Para granular la preparación de lisozima/enzima (líquida o sólida) también se puede añadir antes o durante la etapa de ingrediente de pienso. Típicamente una preparación de lisozima/enzima líquida se añade después de la etapa de granulación. La enzima también se puede incorporar en un aditivo de pienso o premezcla.

[0223] La concentración enzimática final en la dieta está en la gama de 0.01-200 mg de proteína enzimática por kg de dieta, por ejemplo, en el rango de 0.5-25 mg de proteína enzimática por kg de dieta animal.

30 **Composiciones de limpieza o detergentes**

[0224] La lisozima de la invención se puede añadir a y por tanto volverse un componente de una composición de detergente, particularmente en un detergente líquido con un pH de 7 o inferior.

[0225] La composición de detergente de la invención puede por ejemplo ser formulada como un detergente de lavado de la ropa a mano o a máquina que incluye una composición de aditivo de colada adecuado para pretratamiento de tejidos manchados y una composición de suavizante añadida al enjuague, o ser formulada como una composición de detergente para usar en operaciones de limpieza de superficies duras del hogar en general, o ser formulada para operaciones de lavado de la vajilla a mano o a máquina.

[0226] En un aspecto específico, la invención proporciona un aditivo de detergente que comprende la lisozima de la invención. El aditivo de detergente al igual que la composición de detergente puede comprender una o más enzimas adicionales tales como una proteasa, una lipasa, una cutinasa, una amilasa, una carbohidrasa, una celulasa, una pectinasa, una mananasa, una arabinasa, una galactanasa, una xilanasa, una oxidasa, por ejemplo, una lacasa, y/o una peroxidasa.

[0227] En general las propiedades de la enzima(s) elegida deberían ser compatibles con el detergente seleccionado, (es decir pH óptimo, compatibilidad con otros ingredientes enzimáticos y no enzimáticos, etc.), y la(s) enzima(s) debería(n) estar presente(s) en cantidades eficaces.

[0228] En una forma de realización, la invención se dirige a composiciones de limpieza o detergentes que comprenden una enzima de la presente invención en combinación con uno o más componentes de limpieza adicionales. La elección de componentes de limpieza adicionales está en la habilidad del experto e incluye ingredientes convencionales, incluidos los componentes no limitativos ejemplares expuestos a continuación.

[0229] La elección de componentes puede incluir, para el cuidado de textiles, la consideración del tipo de textil que se debe limpiar, el tipo y/o grado de la suciedad, la temperatura en la que debe ocurrir la limpieza, y la formulación del producto detergente. Aunque los componentes mencionados a continuación se categorizan según una función particular, esto no debería ser interpretado como una limitación ya que el componente puede tener una o más funcionalidades adicionales que el experto en la materia apreciará.

[0230] La composición de limpieza o de detergente se puede adecuar para el lavado de tejidos tal como por ejemplo tejidos, telas o lino, o para limpiar superficies duras tales como por ejemplo suelos, mesas, o lavado de la vajilla.

[0231] La invención también se refiere a polinucleótidos que codifican los polipéptidos, constructos de ácidos nucleicos, vectores, y células huéspedes que comprenden los polinucleótidos al igual que métodos de producción y utilización de los polipéptidos.

5 Tensioactivos

[0232] La composición de detergente puede comprender uno o más tensioactivos, que puede ser aniónico y/o catiónico y/o no iónico y/o semipolar y/o zwitteriónico, o una mezcla de los mismos. En una forma de realización particular, la composición de detergente incluye una mezcla de uno o más tensioactivos no iónicos y uno o más tensioactivos aniónicos. El(los) tensioactivo(s) está(n) típicamente presente(s) a un nivel de aproximadamente 0,1 % a 60% en peso, tal como aproximadamente 1% a aproximadamente 40%, o aproximadamente 3% a aproximadamente 20%, o aproximadamente 3% a aproximadamente 10%. El(los) tensioactivo(s) es(son) elegido(s) con base en la aplicación de limpieza deseada, e incluye cualquier tensioactivo(s) convencional(es) conocido(s) en la técnica. Cualquier tensioactivo conocido en la técnica para usar en detergentes puede ser utilizado.

[0233] Cuando se incluye en este el detergente normalmente contendrá de aproximadamente 1% a aproximadamente 40% en peso, tal como de aproximadamente 5% a aproximadamente 30%, incluyendo de aproximadamente 5% a aproximadamente 15%, o de aproximadamente 20% a aproximadamente 25% de un tensioactivo aniónico. Ejemplos no limitativos de tensioactivos aniónicos incluyen sulfatos y sulfonatos, en particular, alquilbencenosulfonatos lineales (LAS), isómeros de LAS, alquilbencenosulfonatos ramificados (BABS), fenilalcanosulfonatos, alfa-olefinsulfonatos (AOS), sulfonatos de olefina, sulfonatos de alqueno, alcano-2,3-diilbis(sulfatos), hidroxialcanosulfonatos y disulfonatos, alquilsulfatos (AS) tal como dodecil sulfato de sodio (SDS), sulfatos de alcohol graso (FAS), sulfatos de alcohol primario (PAS), etersulfatos alcohólicos (AES o AEOS o FES, conocidos también como etoxisulfatos alcohólicos o sulfatos de éter de alcohol graso), alcanosulfonatos secundarios (SAS), sulfonatos de parafina (PS), sulfonatos de éster, ésteres de glicerol de ácido graso sulfonatado, metil ésteres de alfa-sulfo ácido graso (alfa-SFMe o SES) incluyendo sulfonato de éster metílico (MES), ácido alquil- o alquenilsuccínico, ácido dodecenil/tetradecenil succínico (DTSA), derivados de ácido graso de aminoácidos, diésteres y monoésteres de ácido sulfo-succínico o jabón, y combinaciones de los mismos.

[0234] Cuando se incluyen aquí el detergente normalmente contendrá de aproximadamente 0% a aproximadamente 10% en peso de un tensioactivo catiónico. Ejemplos no limitativos de tensioactivos catiónicos incluyen quat de alquildimetiletanolamina (ADMEAQ), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), cloruro de dimetildiestearilamonio (DSDMAC), y alquilbencildimetilamonio, compuestos de amonio cuaternario de alquilo, compuestos de amonio cuaternario alcoxilado (AQA) , y combinaciones de los mismos.

[0235] Cuando se incluye aquí el detergente normalmente contendrá de aproximadamente 0,2% a aproximadamente 40% en peso de un tensioactivo no iónico, por ejemplo, de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 30%, en particular de aproximadamente 1% a aproximadamente 20%, de aproximadamente 3% a aproximadamente 10%, tal como de aproximadamente 3% a aproximadamente 5%, o de aproximadamente 8% a aproximadamente 12%. Ejemplos no limitativos de tensioactivos no iónicos incluyen etoxilatos de alcohol (AE o AEO), propoxilatos de alcohol, alcoholes grasos propoxilados, ésteres alquílicos de ácido graso (PFA) alcoxilado, tales como ésteres alquílicos de ácido graso etoxilado y/o propoxilado, etoxilatos de alquilfenol (APE), etoxilatos de nonilfenol (NPE), alquilpoliglucósidos (APG), aminas alcoxiladas, monoetanolamidas de ácido graso (FAM), dietanolamidas de ácido graso (FADA), monoetanolamidas de ácido graso etoxilado (EFAM), monoetanolamidas de ácido graso propoxilado (PFAM), amidas de ácido graso de polihidroxi alquilo, o derivados de N-acil N-alquil glucosamina (glucamidas, GA, o glucamida de ácido graso, FAGA), al igual que productos disponibles bajo los nombres comerciales SPAN y TWEEN, y combinaciones de los mismos.

[0236] Cuando se incluyen en la presente, el detergente normalmente contendrá de aproximadamente 0% a aproximadamente 10% en peso de un tensioactivo semipolar. Ejemplos no limitativos de tensioactivos semipolares incluyen óxidos de amina (AO) tal como óxido de alquildimetilamina, óxido de N-(coco alquil)-N,N-dimetilamina y óxido de N-(sebo-alquil)-N,N-bis(2-hidroxietyl)amina, alcanolamidas de ácido graso y alcanolamidas de ácido graso etoxilado, y combinaciones de los mismos.

[0237] Cuando se incluyen en la presente, el detergente normalmente contendrá de aproximadamente 0% a aproximadamente 10% en peso de un tensioactivo zwitteriónico. Ejemplos no limitativos de tensioactivos zwitteriónicos incluyen betaina, alquildimetilbetaina, sulfobetaina, y combinaciones de los mismos.

Hidrótropos

[0238] Un hidrótopo es un compuesto que solubiliza compuestos hidrofóbicos en soluciones acuosas (o por el contrario, sustancias polares en un ambiente no polar). Típicamente, hidrótopos tienen un carácter hidrofílico y uno hidrofóbico (llamadas propiedades anfifílicas como se conoce de los tensioactivos); sin

embargo, la estructura molecular de los hidrótropos generalmente no favorece la autoagregación espontánea, véase por ejemplo revisión por Hodgdon y Kaler (2007), Current Opinion in Colloid & Interface Science 12: 121-128. Los hidrótropos no muestran una concentración crítica por encima de la cual ocurre la autoagregación, como se ha descubierto para tensioactivos y lípidos que forman fases micelares, laminares u otras mesofases bien definidas. En cambio, muchos hidrótropos muestran un proceso de agregación de tipo continuo donde los tamaños de los agregados crecen según aumenta la concentración. Sin embargo, muchos hidrótropos alteran las propiedades de comportamiento de fase, de estabilidad, y coloidales de sistemas que contienen sustancias de carácter polar y no polar, incluyendo mezclas de agua, aceite, tensioactivos, y polímeros. Hidrótropos se usan clásicamente a través de industrias farmacéuticas, de cuidado personal, alimentarias, para aplicaciones técnicas. El uso de hidrótropos en composiciones detergentes permiten por ejemplo formulaciones más concentradas de tensioactivos (como en el proceso de compactar detergentes líquidos eliminando el agua) sin inducir fenómenos no deseados tal como separación de fase o alta viscosidad.

[0239] El detergente puede contener 0-5% en peso, tal como aproximadamente 0.5 a aproximadamente 5%, o aproximadamente 3% a aproximadamente 5%, de un hidrótropo. Cualquier hidrótropo conocido en la técnica para usar en detergentes puede ser utilizado. Ejemplos no limitativos de hidrótropos incluyen benceno sulfonato de sodio, p-tolueno sulfonato de sodio (STS), xileno sulfonato de sodio (SXS), cumeno sulfonato de sodio (SCS), cimeno sulfonato de sodio, óxidos de amina, alcoholes y poliglicoléteres, hidroxinaftoato de sodio, hidroxinaftaleno sulfonato de sodio, etilhexil sulfato de sodio, y combinaciones de los mismos.

Constructores y Co-constructores

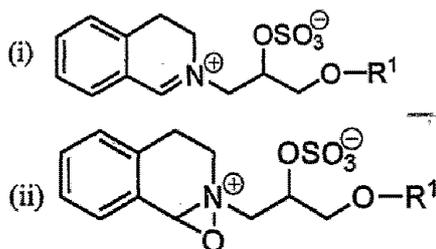
[0240] La composición de detergente puede contener aproximadamente 0-65% en peso, tal como aproximadamente 5% a aproximadamente 45% de un constructor de detergente o co-constructor, o una mezcla de los mismos. En un detergente de lavavajillas, el nivel de constructor es típicamente 40-65%, particularmente 50-65%. El adyuvante y/o co-adyuvante puede particularmente ser un agente quelante que forma complejos hidrosolubles con Ca y Mg. Cualquier adyuvante y/o co-adyuvante conocido en la técnica para usar en los detergentes para la rop pueden ser utilizados. Ejemplos no limitativos de constructores incluyen zeolitas, difosfatos (pifosfatos), trifosfatos tal como trifosfato de sodio (STP o tripolifosfato sódico), carbonatos tales como carbonato de sodio, silicatos solubles tal como metasilicato de sodio, silicatos estratificados (por ejemplo, SKS-6 de Hoechst), etanolaminas tales como 2-aminoetan-1-ol (MEA), dietanolamina (DEA, conocida también como iminodietanol), trietanolamina (TEA, conocida también como 2,2',2"-nitrilotrietanol), y carboximetilo de inulina (CMI), y combinaciones de los mismos.

[0241] La composición de detergente también puede contener 0-20% 0-20% en peso, tal como aproximadamente 5% a aproximadamente 10%, de un co-constructor de detergente, o una mezcla de los mismos. La composición de detergente puede incluir un co-constructor solo, o en combinación con un constructor, por ejemplo, un constructor de zeolita. Ejemplos no limitativos de co-constructores incluyen homopolímeros de poliacrilatos o copolímeros de los mismos, tales como ácido poli(acrílico) (PAA) o ácido copoli(acrílico)/ácido maleico (PAA/PMA). Otros ejemplos no limitativos incluyen citrato, queladores tales como aminocarboxilatos, aminopolicarboxilatos y fosfonatos, y ácido alquil o alqueniilsuccínico. Ejemplos específicos adicionales incluyen ácido 2,2',2"-nitrilotriacético (NTA), ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), ácido dietileno-triaminopentaacético (DTPA), ácido iminodisuccínico (IDS), ácido etilendiamina-N,N'-disuccínico (EDDS), ácido metilglicinadiacético (MGDA), ácido glutámico N,N-diacético (GLDA), ácido 1-hidroxietano-1,1-difosfónico (HEDP), ácido etilendiaminatetra-(metileno-fosfónico) (EDTMPA), ácido dietileno-triaminapentakis(metileno-fosfónico) (DTPMPA o DTPMP), ácido N-(2-hidroxietil)iminodiacético (EDG), ácido aspártico-N-ácido monoacético (ASMA), ácido aspártico N,N-ácido diacético (ASDA), ácido aspártico-N-ácido monopropiónico (ASMP), ácido iminodisuccínico (IDA), ácido N-(2-sulfometil)-aspártico (SMAS), ácido N-(2-sulfoetil)-aspártico (SEAS), ácido N-(2-sulfometil)-glutámico (SMGL), ácido N-(2-sulfoetil)-glutámico (SEGL), ácido N-metiliminodiacético (MIDA), ácido α -alanina-N,N-diacético (α -ALDA), ácido serina-N,N-diacético (SEDA), ácido isoserina-N,N-diacético (ISDA), ácido fenilalanina-N,N-diacético (PHDA), ácido antranílico-N,N-ácido diacético (ANDA), ácido sulfanílico-N, N- ácido diacético (SLDA), ácido taurina N, N-diacético (TUDA) y ácido sulfometil-N,N-diacético (SMDA), N-(2-hidroxietil)-etilendiamina-N, N', N'-triacetato (HEDTA), dietanolglicina (DEG), ácido dietileno-triamina penta(metileno-fosfónico) (DTPMP), ácido aminotris(metileno-fosfónico) (ATMP), y combinaciones y sales derivadas. Otros constructores y/o co-constructores ejemplares son descritos en, por ejemplo, WO 09/102854, US 5977053.

Sistemas blanqueadores

[0242] El detergente puede contener 0-50% en peso, tal como aproximadamente 0.1% a aproximadamente 25%, de un sistema blanqueador. Se puede utilizar cualquier sistema blanqueador conocido en la técnica de uso en los detergentes para la ropa. Componentes de sistema blanqueador adecuados incluyen catalizadores del blanqueamiento, fotoblanqueadores, activadores de blanqueamiento, fuentes de peróxido de hidrógeno tal como percarbonato de sodio y perboratos de sodio, perácidos preformados y sus mezclas derivadas. Perácidos preformados adecuados incluyen, pero de forma no limitativa, ácidos y sales peroxycarboxílicos,

ácidos y sales percarbónicos, ácidos y sales perimídicos, ácidos y sales peroximonosulfúricos, por ejemplo, oxona (R), y sus mezclas derivadas. Ejemplos no limitativos de sistemas blanqueadores incluyen sistemas blanqueadores basados en peróxido, que pueden comprender, por ejemplo, una sal inorgánica, incluyendo sales de metal alcalino tales como sales de perborato de sodio (normalmente mono- o tetrahidrato), percarbonato, persulfato, perfosfato, sales de persilicato, en combinación con un activador blanqueador formador de perácido. El término activador de blanqueamiento se entiende aquí como un compuesto que reacciona con blanqueador de peroxígeno como peróxido de hidrógeno para formar un perácido. El perácido así formado constituye el blanqueador activado. Activadores de blanqueamiento adecuados para ser usados aquí incluyen aquellos de la clase de amidas, imidas o anhídridos de ésteres. Ejemplos adecuados son tetracetilileno diamina (TAED), sulfonato de 4-[(3,5,5-trimetilhexanoil)oxi]benceno de sodio (ISONOBS), ácido diperoxi dodecanoico, 4-(dodecanoiloxi)benzenosulfonato (LOBS), 4-(decanoiloxi)benzenosulfonato, 4-(decanoiloxi)benzoato (DOBS), 4-(nonanoiloxi)-benzenosulfonato (NOBS), y/o aquellos descritos en WO98/17767. Una familia particular de activadores de blanqueamiento de interés fue descrita en EP624154 y particularmente preferido en esta familia es acetil trietil citrato (ATC). ATC o un triglicérido de cadena corta como triacetina tiene la ventaja que es respetuoso con el medioambiente ya que se degrada finalmente en ácido cítrico y alcohólico. Además acetil trietil citrato y triacetina tiene una buena estabilidad hidrolítica en el producto después del almacenamiento y es un activador del blanqueamiento eficaz. ATC finalmente proporciona una buena capacidad de construcción al aditivo de lavandería. Alternativamente, el sistema de blanqueamiento puede comprender peroxiácidos de, por ejemplo, el tipo amida, imida, o sulfona. El sistema blanqueador también puede comprender perácidos tal como ácido 6-(ftalimido)peroxihexanoico (PAP). El sistema blanqueador también puede incluir un catalizador de blanqueamiento. En algunas formas de realización del componente blanqueador puede ser un catalizador orgánico seleccionado del grupo que consiste en catalizadores orgánicos que tienen las fórmulas siguientes:



(iii) y sus mezclas derivadas; donde cada R^1 es independientemente un grupo de alquilo ramificado conteniendo de 9 a 24 carbonos o grupo alquilo lineal que contiene de 11 a 24 carbonos, preferiblemente cada R^1 es independientemente un grupo alquilo ramificado conteniendo de 9 a 18 carbonos o grupo alquilo lineal que contiene de 11 a 18 carbonos, más preferiblemente cada R^1 es independientemente seleccionado del grupo que consiste en 2-propilheptilo, 2-butiloctilo, 2-pentilnonilo, 2-hexildecilo, n-dodecilo, n-tetradecilo, n-hexadecilo, n-octadecilo, isononilo, isodecilo, isotridecilo e iso-pentadecilo. Otros sistemas blanqueadores ejemplares son descritos, por ejemplo en WO2007/087258; WO2007/087244; WO2007/087259 y WO2007/087242. Fotoblanqueadores adecuados pueden por ejemplo ser ftalocianina de zinc sulfonatada.

Polímeros

[0243] El detergente puede contener 0-10% en peso, tal como 0,5-5%, 2-5%, 0,5-2% o 0,2-1% de un polímero. Cualquier polímero conocido en la técnica para el uso en detergentes puede ser utilizado. El polímero puede funcionar como un co-constructor como se ha mencionado anteriormente, o puede proporcionar antirre deposición, protección de fibras, eliminación de suciedad, inhibición de transferencia de tinte, limpieza de grasa y/o propiedades antiespumantes. Algunos polímeros pueden tener más de una de las propiedades anteriormente mencionadas y/o más de uno de los motivos mencionados abajo. Polímeros ejemplares incluyen (carboximetil)celulosa (CMC), alcohol polivinílico (PVA); poli(vinilpirrolidona) (PVP), poli(etilenglicol) u óxido de polietileno (PEG), poli(etilenoimina) etoxilada, inulina de carboximetilo (CMI), y policarboxilatos tales como PAA, PAA/PMA, ácido poliaspártico, y copolímeros de lauril metacrilato/ácido acrílico, CMC modificado hidrofóticamente (HM-CMC) y siliconas, copolímeros de ácido tereftálico y glicoles oligoméricos, copolímeros de poli(etileno tereftalato) y poli(oxieteno tereftalato) (PET-POET), PVP, poli(vinilimidazol) (PVI); poli(vinilpiridina-N-óxido) (PVPO o PVPNO) y polivinilpirrolidona-vinilimidazol (PVPVI). Otros polímeros ejemplares incluyen policarboxilatos sulfonatados, óxido de polietileno y óxido de polipropileno (PEO-PPO) y diquaternium etoxi sulfato. Otros polímeros ejemplares se describen en, por ejemplo, WO 2006/130575. Sales de los polímeros anteriormente mencionados son contempladas también.

Agentes de matizado de tejidos

[0244] Las composiciones detergentes de la presente invención también pueden incluir agentes de matizado de tejidos tales como colorantes o pigmentos, que cuando se formulan en composiciones detergentes pueden depositar sobre un tejido cuando dicho tejido se contacta con una solución de lavado comprendiendo dichas

composiciones detergentes y así alterando el tinte de dicho tejido a través de la absorción/reflexión de luz visible. Agentes blanqueadores fluorescentes emiten al menos alguna luz visible. En cambio, agentes de matizado de tejido alteran el tinte de una superficie ya que absorben al menos una porción del espectro de luz visible. Agentes de matizado de tejido adecuado incluyen colorantes y conjugados de tinte-arcilla, y también pueden incluir pigmentos. Colorantes adecuados incluyen colorantes de molécula pequeña y colorantes poliméricos. Colorantes de molécula pequeña adecuados incluyen colorantes de molécula pequeña seleccionados del grupo que consiste en colorantes que caen en las clasificaciones del índice de color (C.I.) de Direct Blue, Direct Red, Direct Violet, Acid Blue, Acid Red, Acid Violet, Basic Blue, Basic Violet and Basic Red, o mezclas derivadas, por ejemplo, como se describe en WO2005/03274; WO2005/03275; WO2005/03276 y EP1876226. La composición de detergente preferiblemente comprende de aproximadamente 0,00003 % en peso a aproximadamente 0,2 % en peso, de aproximadamente 0.00008 % en peso a aproximadamente 0,05 % en peso, o incluso de aproximadamente 0,0001 % en peso a aproximadamente 0,04 % en peso de agente de matizado de tejido. La composición puede comprender de 0,0001 % en peso a 0.2 % en peso agente de matizado de tejido, esto se puede preferir especialmente cuando la composición está en forma de una bolsa de dosis unitaria. Agentes de matizado adecuados son también descritos en, por ejemplo WO 2007/087257 y WO2007/087243.

Enzimas adicionales

[0245] En un aspecto, la presente invención proporciona un aditivo de detergente que comprende una lisozima de la presente invención. El aditivo de detergente al igual que la composición de detergente puede comprender una o más enzimas [adicionales] tal como una proteasa, lipasa, cutinasa, una amilasa, carbohidrasa, celulasa, pectinasa, mananasa, arabinasa, galactanasa, xilanas, oxidasa, por ejemplo, una lacasa, y/o peroxidasa.

[0246] En general las propiedades de la(s) enzima(s) seleccionada(s) debería(n) ser compatible(s) con el detergente seleccionado, (es decir, pH óptimo, compatibilidad con otros ingredientes enzimáticos y no enzimáticos, etc.), y la(s) enzima(s) debería(n) estar presente(s) en cantidades eficaces.

[0247] Celulasas: celulasas adecuadas incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico. Mutantes químicamente modificados o creados genéticamente de proteínas están incluidos. Celulasas adecuadas incluyen celulasas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, por ejemplo, las celulasas fúngicas producidas de *Humicola insolens*, *Myceliophthora thermophila* y *Fusarium oxysporum* descritas en US 4,435,307, US 5,648,263, US 5,691,178, US 5,776,757 y WO 89/09259.

[0248] Celulasas especialmente adecuadas son las celulasas alcalinas o neutras que tienen beneficios de cuidado de color. Ejemplos de tales celulasas son celulasas descritas en EP 0 495 257, EP 0 531 372, WO 96/11262, WO 96/29397, WO 98/08940. Otros ejemplos son variantes de celulasa tales como los descritos en WO 94/07998, EP 0 531 315, US 5,457,046, US 5,686,593, US 5,763,254, WO 95/24471, WO 98/12307 y PCT/DK98/00299.

[0249] Celulasas disponibles comercialmente incluyen Celluzyme™, y Carezyme™ (Novozymes A/S), Clazinase™, y Puradax HA™ (Genencor International Inc.), y KAC-500(B)™ (Kao Corporation).

[0250] Proteasas: proteasas adecuadas incluyen aquellas de origen animal, vegetal u origen microbiano. Se prefiere el origen microbiano. Mutantes químicamente modificados o creados genéticamente de proteínas están incluidos. La proteasa puede ser una proteasa serínica o una metaloproteasa, preferiblemente una proteasa microbiana alcalina o una proteasa de tipo tripsina. Ejemplos de proteasas alcalinas son subtilisinas, especialmente aquellas derivadas de *Bacillus*, por ejemplo, subtilisina Novo, subtilisina Carlsberg, subtilisina 309, subtilisina 147 y subtilisina 168 (descrita en WO 89/06279). Ejemplos de proteasas de tipo tripsina son tripsina (por ejemplo, de origen porcino o bovino) y la proteasa de *Fusarium* descrita en WO 89/06270 y WO 94/25583.

[0251] Ejemplos de proteasas útiles son las variantes descritas en WO 92/19729, WO 98/20115, WO 98/20116, y WO 98/34946, especialmente las variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 27, 36, 57, 76, 87, 97, 101, 104, 120, 123, 167, 170, 194, 206, 218, 222, 224, 235, y 274.

[0252] Enzimas proteásicas disponibles comercialmente preferidas incluyen Alcalase™, Savinase™, Primase™, Duralase™, Esperase™, y Kannase™ (Novozymes A/S), Maxatase™, Maxacal™, Maxapem™, Properase™, Purafect™, Purafect OxP™, FN2™, y FN3™ (Genencor International Inc.).

[0253] Lipasas y cutinasas: lipasas y cutinasas adecuadas incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico. Enzimas mutantes modificadas químicamente o diseñadas de proteínas están incluidas. Ejemplos incluyen lipasa de *Thermomyces*, por ejemplo de *T. Lanuginosus* (anteriormente llamada *Humicola lanuginosa*) como se describe en EP258068 y EP305216, cutinasa de *Humicola*, por ejemplo *H. Insolens* (WO96/13580), lipasa de cepas de *Pseudomonas* (algunas de estas ahora red denominadas *Burkholderia*), por ejemplo *P.*

alcaligenes o *P. pseudoalcaligenes* (EP218272), *P. cepacia* (EP331376), *P. Sp. Cepa SD705* (WO95/06720 & WO96/27002), *P. wisconsinensis* (WO96/12012), lipasas de *Streptomyces* de tipo GDS L(WO10/065455), cutinasa de *Magnaporthe grisea* (WO10/107560), cutinasa de *Pseudomonas mendocina* (US5,389,536), lipasa de *Thermobifida fusca* (WO11/084412), lipasa de *Geobacillus stearothermophilus* (WO11/084417)
 5 lipasa de *Bacillus subtilis* (WO11/084599), y lipasa de *Streptomyces griseus* (WO11/150157) y *S. pristinaespiralis* (WO12/137147).

[0254] Otros ejemplos son variantes de lipasa tales como los descritos en EP407225; WO92/05249; WO94/01541; WO94/25578; WO95/14783; WO95/30744; WO95/35381; WO95/22615; WO96/00292;
 10 WO97/04079; WO97/07202; WO00/34450; WO00/60063; WO01/92502; WO07/87508 y WO09/109500.

[0255] Productos de lipasa comercial preferidos incluyen incluyen Lipolase™, Lipex™; Lipolex™ y Lipoclean™ (Novozymes A/S), Lumafast (originalmente de Genencor) y Lipomax (originalmente de Gist-Brocades).
 15

[0256] Otros ejemplos son lipasas a veces referidas como aciltransferasas o perhidrolasas, por ejemplo aciltransferasas con homología a lipasa A de *Candida antarctica* (WO10/111143), aciltransferasa de *Mycobacterium smegmatis* (WO05/56782), perhidrolasas de la familia CE 7 (WO09/67279), y variantes de perhidrolasa de *M. smegmatis* en particular la variante S54V usada en el producto comercial Gentle Power Bleach de Huntsman Textile Effects Pte Ltd (WO10/100028).
 20

[0257] Amilasas: amilasas adecuadas (α y/o β) incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico. Mutantes químicamente modificados o creados genéticamente de proteínas están incluidos. Amilasas incluyen, por ejemplo, α -amilasas obtenidas de *Bacillus*, por ejemplo, una cepa especial de *Bacillus licheniformis*, descrita con más detalle en GB 1,296,839.
 25

[0258] Ejemplos de amilasas útiles son las variantes descritas en WO 94/02597, WO 94/18314, WO 96/23873, y WO 97/43424, especialmente las variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 15, 23, 105, 106, 124, 128, 133, 154, 156, 181, 188, 190, 197, 202, 208, 209, 243, 264, 304, 305, 391, 408, y 444.
 30

[0259] Amilasas disponibles comercialmente son Duramyl™, Termamyl™, Fungamyl™, Stainzyme™, Natalase™ y BAN™ (Novozymes A/S), Rapidase™ y Purastar™ (de Genencor International Inc.).
 35

[0260] Peroxidasas/oxidadas: peroxidasas/oxidadas adecuadas incluyen aquellas de origen vegetal, bacteriano o fúngico. Mutantes químicamente modificados o creados genéticamente de proteínas están incluidos. Ejemplos de peroxidasas útiles incluyen peroxidasas de *Coprinus*, por ejemplo, de *C. cinereus*, y variantes de las mismas como aquellas descritas en WO 93/24618, WO 95/10602, y WO 98/15257. Peroxidasas disponibles comercialmente incluyen Guardzyme™ (Novozymes A/S).
 40

[0261] La(s) enzima(s) detergente(s) se puede(n) incluir en una composición de detergente añadiendo aditivos separados que contienen una o más enzimas, o añadiendo un aditivo combinado comprendiendo todas estas enzimas. Un aditivo de detergente de la invención, es decir, un aditivo separado o un aditivo combinado, puede ser formulado, por ejemplo, como un granulado, líquido, lodo, etc. Formulaciones de aditivo de detergente preferidas son granulados, en particular granulados no en polvo, líquidos, en particular líquidos estabilizados, o suspensiones acuosas.
 45

[0262] Granulados no en polvo se pueden producir, por ejemplo, como se describe en US 4,106,991 y 4,661,452 y pueden opcionalmente ser recubiertos por métodos conocidos en la técnica. Ejemplos de materiales de recubrimiento ceroso son productos de óxido de poli(etileno) (polietilenoglicol; PEG) con pesos molares medios de 1000 a 20000; nonilfenoles etoxilados teniendo de 16 a 50 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos etoxilados donde el alcohol contiene de 12 a 20 átomos de carbono y en el cual hay 15 a 80 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos; ácidos grasos; y mono- y di- y triglicéridos de ácidos grasos. Ejemplos de materiales de recubrimiento que forman películas adecuados para aplicación por técnicas de lecho fluidificado se dan en GB 1483591. Preparaciones enzimáticas líquidas pueden, por ejemplo, ser estabilizadas añadiendo un poliol tal como propilenglicol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico o ácido bórico según métodos establecidos. Enzimas protegidas se pueden preparar según el método descrito en EP 238,216.
 50
 55

60 Materiales complementarios

[0263] Cualquier componente detergente conocido en la técnica para usar en los detergentes de lavandería también pueden ser utilizados. Otros componentes de detergente opcionales incluyen agentes anticorrosivos, agentes anti encogimiento, agentes antirredeposición de suciedad, agentes antiarrugas, bactericidas, ligantes, inhibidores de corrosión, agentes desintegrantes/de desintegración, colorantes, estabilizadores enzimáticos (incluyendo ácido bórico, boratos, CMC, y/o polioles tal como propilenglicol), acondicionadores
 65

de tejidos incluyendo arcillas, productos de relleno/ayudantes del tratamiento, agentes blanqueadores fluorescentes/abrilantadores ópticos, potenciadores de espuma, reguladores de espuma, perfumes, agentes suspensores de suciedad, suavizantes, supresores de espuma, inhibidores de decoloración, y agentes de efecto mecha, bien solos o en combinación. Cualquier ingrediente conocido en la técnica para usar en los detergentes de lavandería puede ser utilizado. La elección de tales ingredientes está bien en la habilidad del experto.

[0264] Dispersantes: las composiciones detergentes de la presente invención también pueden contener dispersantes. En particular detergentes en polvo pueden comprender dispersantes. Materiales orgánicos hidrosolubles adecuados incluyen ácidos homo- o co-poliméricos o sus sales, donde el ácido policarboxílico comprende al menos dos radicales de carboxilo separados entre sí por no más de dos átomos de carbono. Dispersantes adecuados son por ejemplo descritos en Powdered Detergents, Surfactant science series volume 71, Marcel Dekker, Inc.

[0265] Agentes inhibidores de transferencia de tinte: las composiciones detergentes de la presente invención pueden también incluir uno o más agentes inhibidores de transferencia de tinte. Agentes inhibidores de transferencia de tinte poliméricos adecuados incluyen, pero de forma no limitativa, polímeros de polivinilpirrolidona, polímeros n-óxido de poliamina, copolímeros de N-vinilpirrolidona y N-vinilimidazol, poliviniloxazolidonas y polivinilimidazolas o mezclas derivadas. En caso de existir en una composición de sujeto, los agentes de inhibición de transferencia de tinte pueden estar presentes a niveles de aproximadamente 0,0001 % a aproximadamente 10%, de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 5% o incluso de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 3% en peso de la composición.

[0266] Agente blanqueador fluorescente: las composiciones detergentes de la presente invención preferiblemente también contendrán componentes adicionales que pueden teñir artículos que son limpiados, tal como agente blanqueador fluorescente o blanqueador óptico. Cuando está presente el abrilantador está preferiblemente a un nivel de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,5%. Cualquier agente blanqueador fluorescente adecuado para usar en una composición de detergente para ropa se puede utilizar en la composición de la presente invención. Los agentes blanqueadores fluorescentes usados más frecuentemente son aquellos pertenecientes a las clases de derivados de ácido sulfónico-diaminoestilbeno, derivados de diarilpirazolina y derivados de bisfenilo-distirilo. Ejemplos del tipo de derivado de ácido sulfónico de diaminoestilbeno de agentes blanqueadores fluorescentes incluyen las sales de sodio de: 4,4'-bis-(2-dietanolamino-4-anilino-s-triazin-6-ilamino) estilbeno-2,2'-disulfonato; 4,4'-bis-(2,4-dianilino-s-triazin-6-ilamino)estilbeno-2,2'-disulfonato; 4,4'-bis-(2-anilino-4(N-metil-N-2-hidroxi-etilamino)-s-triazin-6-ilamino)estilbeno-2,2'-disulfonato; 4,4'-bis-(4-fenil-2,1,3-triazol-2-il)estilbeno-2,2'-disulfonato; 4,4'-bis-(2-anilino-4(1-metil-2-hidroxi-etilamino)-s-triazin-6-ilamino)estilbeno-2,2'-disulfonato y 2-(estilbil-4"-nafto-1.,2':4,5)-1,2,3-triazol-2"-sulfonato. Agentes blanqueadores fluorescentes preferidos son Tinopal DMS y Tinopal CBS disponibles de Ciba-Geigy AG, Basilea, Suiza. Tinopal DMS es la sal disódica de 4,4'-bis-(2-morfolino-4-anilino-s-triazin-6-ilamino)estilbeno disulfonato. Tinopal CBS es la sal disódica de 2,2'-bis-(fenil-estiril)disulfonato. Preferidos también como agente blanqueador fluorescente es el Parawhite KX, provisto por Paramount Minerals and Chemicals, Mumbai, India disponible comercialmente. Otro fluorescente adecuado para usar en la invención incluye las 1-3-diaril pirazolininas y las 7-alquilaminocumarinas. Niveles de abrilantador fluorescente adecuados incluyen niveles inferiores de aproximadamente 0,01, de 0,05, de aproximadamente 0.1 o incluso de aproximadamente 0,2 % en peso a niveles superiores de 0,5 o incluso 0,75 % en peso.

[0267] Polímeros de eliminación de suciedad: las composiciones detergentes de la presente invención pueden también incluir uno o más polímeros de eliminación de suciedad que ayudan a la eliminación de suciedad de tejidos tal como algodón y tejidos a base de poliéster, en particular la eliminación de suciedad hidrofóbica de tejidos a base de poliéster. Los polímeros de eliminación de suciedad pueden por ejemplo ser polímeros no iónicos o a base de tereftalato aniónico, polivinil caprolactama y copolímeros relacionados, copolímeros de injerto de vinilo, poliamidas de poliéster, véase por ejemplo capítulo 7 en Powdered Detergents, Surfactant science series volumen 71, Marcel Dekker, Inc. Otro tipo de polímeros de eliminación de suciedad son polímeros de limpieza de grasa alcoxilados anfifílicos que comprenden una estructura de núcleo y una pluralidad de grupos de alcoxilato fijados a esta estructura de núcleo. La estructura de núcleo puede comprender una estructura de polialquilenimina o una estructura de polialcanolamina como se describe en detalle en WO 2009/087523. Copolímeros de injerto aleatorio además son polímeros de eliminación de suciedad adecuados. Copolímeros de injerto adecuados son descritos con más detalle en WO 2007/138054, WO 2006/108856 y WO 2006/113314. Otros polímeros de eliminación de suciedad son estructuras de polisacárido sustituidas especialmente estructuras celulósicas sustituidas tales como derivados de celulosa modificados tales como los descritos en EP 1867808 o WO 2003/040279. Polímeros celulósicos adecuados incluyen celulosa, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, amidas de celulosa y sus mezclas derivadas. Polímeros celulósicos adecuados incluyen celulosa modificada aniómicamente, celulosa modificada no iónicamente, celulosa modificada catiónicamente, celulosa modificada zwitteriónicamente, y sus mezclas derivadas. Polímeros celulósicos adecuados incluyen metilcelulosa, carboximetilcelulosa,

etilcelulosa, hidroxil etilcelulosa, hidroxil propil metilcelulosa, éster de carboximetilcelulosa, y sus mezclas derivadas.

[0268] Agentes de antirredeposición: las composiciones detergentes de la presente invención pueden también incluir uno o más agentes de antirredeposición tal como carboximetilcelulosa (CMC), alcohol polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona (PVP), polioxietileno y/o polietilenglicol (PEG), homopolímeros de ácido acrílico, copolímeros de ácido acrílico y ácido maleico, y polietilenoiminas etoxiladas. Los polímeros a base de celulosa descritos arriba bajo polímeros de eliminación de suciedad también pueden funcionar como agentes de antirredeposición.

[0269] Otros materiales complementarios adecuados incluyen, pero de forma no limitativa, agentes de antirretracción, agentes antiarrugas, bactericidas, ligantes, portadores, colorantes, estabilizadores enzimáticos, suavizantes, productos de relleno, reguladores de espuma, hidrótrofos, perfumes, pigmentos, supresores de espuma, solventes, y estructurantes para detergentes líquidos y/o agentes de elastización de estructura.

Biopelículas

[0270] Microorganismos que crecen en biopelículas son menos susceptibles a todos los tipos de agentes antimicrobianos que los mismos microorganismos cuando crecen en los cultivos de suspensión convencionales.

[0271] Es bien conocido que bacterias subalimentadas pueden ser mucho menos susceptibles a una variedad de desafíos antimicrobianos. Por ejemplo, un número de antibióticos tradicionales tal como penicilina, funcionan mal en bacterias de división lenta o sin división. Como la lisozima ataca y destruye la capa de peptidoglicano independientemente del estado de crecimiento de las bacterias, permanece eficaz.

Control de biopelícula: ejemplo líneas de agua dental:

[0272] La acumulación de biopelícula dentro de una línea de agua dental puede contener biopelículas consistentes en *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Legionella* sp. por nombrar unas pocas. Hay también la posibilidad de colonización de especies generalmente encontradas en la cavidad bucal como resultado del fallo de válvulas antirretracción en el sistema. El riesgo de infección cruzada se vuelve aún más un riesgo potencial por supuesto cuando pacientes inmunocomprometidos se implican y en este día y edad los números de pacientes dentro de esta categoría continúa aumentando firmemente. La necesidad existe para un control eficaz de acumulación de biopelícula bacteriana en las líneas de agua dental. Una revisión de biopelículas puede ser encontrada: Watnick P y Kolter R (2000), "Biofilm, city of microbes", J Bacteriol.;182(10):2675-9.

[0273] Un ejemplo típico de un producto de pastilla para la garganta comercial es Lysopaine producido por: BOEHRINGER INGELHEIM FRANCE

Ingredientes activos:

BACITRACINA 200 U.I. (hasta 65 UI/mg)
PAPAÍNA 2 mg hasta 30 NK / mg
CLORHIDRATO DE LISOZIMA 5 mg
hasta 26000 U FIP / mg: unidades determinadas midiendo la cinética OD de lisis de bacterias suspendidas en el tampón. La determinación de unidad fue medida por lisis inducida por cambio en la turbidez de un cultivo bacteriano suspendido en el tampón.

Ingredientes no activos:

Excipiente de SACARINA
Excipiente de ESTEARATO DE MAGNESIO
Aromatizante de Mentol
Excipiente de SORBITOL

[0274] Para tratamiento local de infecciones de puntos limitado a las membranas bucales de la orofaringe. Precaución, si las indicaciones clínicas de una infección bacteriana general son evidentes, se aconseja terapia antibiótica.

Pasta dental:

[0275] La lisozima se puede usar sola o en combinación con otras enzimas o incluso péptidos antimicrobianos. Ejemplos de otras enzimas son oxidasa de glucosa y lactoperoxidasa.

[0276] Una composición de pasta dental típica incluyendo lisozima es "Biotene" por Laclede, Inc., 2030 East University Drive, Rancho Dominguez, CA 90220, EE.UU.

5 Ingredientes activos

[0277] Contiene: lactoperoxidasa (100gm)

Ingredientes no activos

10

[0278] Glucosa-oxidasa, lisozima, monofluorofosfato de sodio, Sorbitol, glicerina, pirofosfato de calcio, sílice hidratada, Zylitol, goma de celulosa, aroma, benzoato sódico, beta-D-glucosa, tiocianato potásico

15

[0279] La presente invención es posteriormente descrita por los ejemplos siguientes que no deberían ser interpretados como limitación del ámbito de la invención.

EJEMPLOS

Cepas

20

[0280] *Aspergillus aculeatus* CBS 172.66 fue usado como la fuente de ADN para obtener la región codificante que codifica el candidato de la lisozima GH23. Según Central Bureau vor Schimmelkulture, *Aspergillus aculeatus* CBS 172.66 fue aislada por K.B. Raper en 1962 de suelo tropical.

25

[0281] La cepa MT3568 de *Aspergillus oryzae* fue usada para la expresión del gen de *A. Aculeatus* que codifica la enzima. *A. oryzae* MT3568 es un derivado de gen interrumpido de *amdS* (acetamidasa) de *Aspergillus oryzae* JaL355 (WO 2002/40694) donde auxotrofia de *pyrG* fue restaurada por la interrupción de la acetamidasa del gen (*amdS*) de *A. oryzae* con el gen *pyrG*. Según Central Bureau vor Schimmelkulture, *Acremonium alkalophilum* CBS 114.92 fue aislado por A. Yoneda en 1984 desde el lodo de compost de heces de cerdo cerca del lago Tsukui, Japón.

30

Medios y soluciones

35

[0282] Medio YP fue compuesto por 10 g de extracto de levadura, 20 g de bactopectona, y agua desionizada a 1 litro.

[0283] Medio LB fue compuesto por 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de cloruro sódico, y agua desionizada a 1 litro.

40

[0284] Medio de agar Horikoshi fue compuesto por: 1% (p/v) dextrosa, 1% almidón soluble, 0.5% (p/v) peptona, 0.5% extracto de levadura de (p/v), 0.02% (p/v) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1% (p/v) K_2HPO_4 , y 15 g (p/v) de Bacto-agar. 1 % (p/v) Na_2CO_3 fue añadido separadamente después de la esterilización.

45

[0285] Placas de agar PDA fueron compuestas por infusión de patata (infusión de patata fue hecha por ebullición de 300 g de patatas cortadas (lavadas pero no peladas) en agua durante 30 minutos y luego decantando o colando el caldo a través de estopilla. Agua destilada fue luego añadida hasta que el volumen total de la suspensión fue un litro, seguido de 20 g (p/v) de dextrosa y 20 g (p/v) de polvo de agar. El medio fue esterilizado por la autoclave a 15 psi durante 15 minutos (Bacteriological Analytical Manual, 8ª edición, Revisión A, 1998).

50

[0286] Placas de sacarosa de COVE fueron compuestas por 342 g de sacarosa, 20 g de polvo de agar, 20 ml de solución salina de COVE, y agua desionizada hasta 1 litro. El medio fue esterilizado por la autoclave a 15 psi durante 15 minutos (Bacteriological Analytical Manual, 8ª edición, Revisión A, 1998). El medio fue enfriado hasta 60°C y 10 mM acetamida, 15 mM CsCl y Tritón X-100 (50 µl/500 ml) fueron añadidos.

55

[0287] Placas de LB agar fueron compuestas por 37 g de LB agar y agua desionizada hasta 1 litro.

60

[0288] Solución salina de COVE fue compuesta por 26 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 26 g de KCL, 26 g de KH_2PO_4 , 50 ml de solución de metal traza de COVE, y agua desionizada hasta 1 litro.

[0289] Solución de metal traza de COVE fue compuesto por 0,04 g de $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$, 0.4 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 1,2 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,7 g de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0.8 g de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 10 g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, y agua desionizada hasta 1 litro.

65

[0290] Medio Dap-4C fue compuesto por 20 g de dextrosa, 10 g de maltosa, 11 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g de KH_2PO_4 , 2 g de ácido cítrico, 5.2 g de $K_3PO_4 \cdot H_2O$, 0.5 g de extracto de levadura (Difco), 1 ml de

antiespumante, 0,5 ml solución de metales traza KU6, 2,5 g de CaCO₃, y agua desionizada hasta 1 litro. El medio fue esterilizado por autoclave a 15 psi durante 15 minutos (Bacteriological Analytical Manual, 8ª edición, Revisión A, 1998). Antes del uso, 3,5 ml de 50% (NH₄)₂HPO₄ estéril y 5 ml de 20% ácido láctico estéril fueron añadidos por 150 ml de medio.

[0291] Medio de glucosa YP+2% fue compuesto por 1% de extracto de levadura, 2% de peptona y 2% de glucosa.

Ejemplo 1: ensayo de lisozima

[0292] *Xanthomonas campestris* es el organismo de producción para toda la producción de goma xantana. La separación de células de *Xanthomonas* desde la solución de xantano altamente viscoso es un proceso de alto coste en la producción industrial (Homma et al., EP690072, Murofushi et al., EP718311, US5702927). Hoy en día, el método favorecido para recuperar el xantano del líquido de fermentación es precipitación con alcohol, principalmente isopropanol, después de pasteurización para destruir las células bacterianas y enzimas (Cottrell, W. I.; Kang, S. K. Dev. (1978), "Xanthan gum: A unique bacterial polysaccharide for food applications", Ind. Microbiol, 19:177). Posteriormente el precipitado de xantano/detrito celular es secado por atomización y molido hasta obtener un polvo. El alcohol se recupera por destilación. Debido a las cantidades significativas de detrito de pared celular de *Xanthomonas* en algunas preparaciones comerciales de goma xantana, y este detrito es material de pared celular de *Xanthomonas* rico en peptidoglicano, la goma se puede usar como un ensayo conveniente para la actividad de degradación de peptidoglicano.

Ensayo de placa sólida:

[0293] Goma xantana preparada comercialmente (Sigma #G-1253) es disuelta en una solución tamponada o medios de crecimiento bacteriano a 0,5% p/v en presencia de 0,7% agarosa y luego sometida a autoclave. Preparaciones enzimáticas, sobrenadantes u organismos enteros son bien depositados en pocillos retirados de las placas de agar Bacto o depositados directamente en la superficie de los medios. Las preparaciones son capaces de formar zonas de aclaramiento en las placas. Estas zonas de aclaramiento pueden indicar degradación del material de la pared celular bacteriana.

Ensayo de aclarado líquido:

[0294] Goma xantana preparada comercialmente es disuelta en una solución tamponada en presencia o ausencia de cloruro sódico. La solución se somete a autoclave y se usa para estudios de compensación de goma xantana. Preparaciones enzimáticas, sobrenadantes u organismos enteros se agregan al medio de ensayo y se incuban. Tratamientos resultantes se miden en un espectrofotómetro para determinar el OD de la solución. Típicamente se usa una longitud de onda de 600nm.

Ejemplo 2: clonación y caracterización de lisozima GH23 de *Aspergillus aculeatus* (SEQ ID N.º: 2)

[0295] Información de la secuencia genómica fue generada por el U.S. Department of Energy Joint Genome Institute (JGI). Según Central Bureau vor Schnimmekulture, *Aspergillus aculeatus* CBS 172.66 fue aislada por K.B. Raper en 1962 de suelo tropical. Un ensamblaje preliminar del genoma fue descargado de JGI y analizado utilizando el Pedant-Pro™ Sequence Analysis Suite (Biomax Informatics AG, Martinsried, Alemania). Modelos de gen construidos por el software fueron usados como un punto de partida para la detección de homólogos de GH23 en el genoma. Modelos genéticos más precisos fueron construidos manualmente utilizando secuencias proteínicas de GH23 múltiples conocidas como una guía.

[0296] Para generar ADN genómico para amplificación de PCR, *Aspergillus aculeatus* CBS 172.66 fue propagado en placas de agar PDA por el crecimiento a 26°C durante 7 días. Esporas cosechadas de las placas de PDA fueron usadas para inocular 25 ml de medio de glucosa YP+2% en un matraz de agitación disipado e incubadas a 26°C durante 48 horas con agitación a 200 r.p.m.

[0297] ADN genómico fue aislado según un protocolo modificado de FastDNA® SPIN (Qbiogene, Inc., Carlsbad, CA, USA). En resumen, un equipo FastDNA® SPIN Kit for Soil (Qbiogene, Inc., Carlsbad, CA, EE.UU) fue usado en un Sistema de Homogeneización FastPrep® 24 (MP Biosciences, Santa Ana, CA, USA). Dos ml de material fúngico de los cultivos anteriores fueron cosechados por centrifugación a 14,000 x g durante 2 minutos. El sobrenadante fue quitado y el granulado resuspendido en 500 µl de agua desionizada. La suspensión fue transferida a un tubo Lysing Matrix E FastPrep® (Qbiogene, Inc., Carlsbad, CA, EE.UU) y 790 µl de tampón de fosfato sódico y 100 µl de tampón MT del equipo de FastDNA® SPIN fueron añadidos al tubo. La muestra fue luego fijada en el instrumento FastPrep® (Qbiogene, Inc., Carlsbad, CA, EE.UU) y procesada durante 60 segundos a una velocidad de 5,5 m/seg. La muestra fue luego centrifugada a 14000 x g durante dos minutos y el sobrenadante transferido a un tubo EPPENDORF® limpio. Un volumen de 250 µl de reactivo PPS del equipo FastDNA® SPIN fue añadido y luego la muestra fue mezclada suavemente por inversión. La muestra fue centrifugada nuevamente a 14000 x g durante 5

minutos. El sobrenadante fue transferido a un tubo de 15 ml seguido de 1 ml de la suspensión de Binding Matrix del equipo FastDNA® SPIN y luego mezclado por inversión durante dos minutos. La muestra fue colocada en un soporte para tubos fijo y la matriz de sílice se dejó asentar durante 3 minutos. Un volumen de 500 µl del sobrenadante fue quitado y descartado y luego la muestra restante fue resuspendida en la matriz. La muestra fue luego transferida a un tubo de filtro SPIN del equipo FastDNA® SPIN y centrifugada a 14000 x g durante 1 minuto. El tubo de captura fue vaciado y la suspensión de matriz restante añadida al tubo de filtro SPIN. La muestra fue centrifugada nuevamente (14000 x g, 1 minuto). Un volumen de 500 µl de solución SEWS-M del equipo FastDNA® SPIN se añadió al tubo de filtro SPIN y la muestra fue centrifugada a la misma velocidad durante 1 minuto. El tubo de captura fue vaciado y el filtro SPIN sustituido en el tubo de captura. La unidad fue centrifugada a 14000 x g durante 2 minutos para "secar" la matriz de solución de lavado SEWS-M residual. El filtro SPIN fue colocado en un tubo de captura reciente y se dejó secar al aire durante 5 minutos a temperatura ambiente. La matriz fue suavemente resuspendida en 100 µl de DES (agua libre de DNasa/pirógeno) con una punta de pipeta. La unidad fue centrifugada (14000 x g, 1 minuto) para eluir el ADN genómico seguido de elución con 100 µl de 10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 8.0 por centrifugación renovada a 14000 x g durante 1 minuto y los eluatos fueron combinados. La concentración del ADN cosechado del tubo de captura fue medida por un espectrofotómetro de UV a 260 nm.

Construcción de un vector de expresión de *Aspergillus oryzae* que contiene la secuencia genómica de CBS 172.66 de *Aspergillus aculeatus* que codifica un polipéptido P24DZF de la familia GH23 que tiene actividad de lisozima.

[0298] Dos cebadores oligonucleótidos sintéticos mostrados en la tabla 1 a continuación fueron diseñados para amplificar por PCR el gen P8EH GH23 de CBS 172.66 de *Aspergillus aculeatus* del ADN genómico. Un equipo IN-FUSION™ Cloning (Clontech, Mountain View, CA, EE.UU) fue usado para clonar el fragmento directamente en el vector de expresión pDau109 (WO 2005/042735).

Tabla 1: cebadores usados para amplificación por PCR de GH23

Gen GH23	Cebador sentido específico	Cebador antisentido específico
<i>Aspergillus aculeatus</i> CBS 172.66	F- P8EH 5'- <u>ACACA</u> ACTGGGGATCCACCATGCA GTTGAACA ACTTCTCT-3' (SEQ ID NO: 9)	R- P8EH 5'-AGATCTCGAGAAGCTT ACTATGCG CTCAGGGT GCACT-3' (SEQ ID NO: 10)

[0299] Letras en negrita representan secuencia codificante. La secuencia subrayada es homóloga a los sitios de inserción de pDau109.

[0300] La reacción por PCR (25 µl) fue compuesta por 12,5 µl de 2X IPROOF™ HF Master Mix, 0,5 µl de cebador F- P24DZF (100 µM), 0,5 µl de cebador R- P24DZF (100 µM), 0,5 µl de genómico (100 ng/µl), y 11 µl de agua desionizada. La reacción por PCR fue incubada en un DYAD® Dual-Block Thermal Cycler (MJ Research Inc., Waltham, MA, EE.UU) programado para 1 ciclo a 98°C durante 30 segundos; 30 ciclos cada uno a 98°C durante 10 segundos, 55°C durante 10 segundos, y 72°C durante 60 segundos; y 1 ciclo a 72°C durante 10 minutos. Las muestras fueron enfriadas a 10°C antes de la eliminación y posterior tratamiento.

[0301] Cinco µl de la reacción por PCR fueron analizados por 1% electroforesis en gel de agarosa usando tampón TAE donde un producto de aproximadamente 770 bp fue observado. La reacción por PCR restante fue purificada utilizando un equipo ILLUSTRATE™ GFX™ PCR DNA y Gel Band Purification según las instrucciones del fabricante.

[0302] El fragmento fue luego clonado en pDau109 digerido con Hind III y Bam HI utilizando un equipo IN-FUSION™ Cloning dando como resultado el plásmido pP8EH. Clonación del gen P24DZF en pDau109 digerido con Hind III-Bam HI resultó en la transcripción del gen P24DZF de *Aspergillus aculeatus* bajo el control de un promotor doble NA2-tpi. NA2-tpi es un promotor modificado del gen que codifica la alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* donde el líder no traducido ha sido sustituido por un líder no traducido del gen que codifica la triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

[0303] El protocolo de clonación fue realizado según las instrucciones del equipo IN-FUSION™ Cloning que genera un constructo de P24DZF GH23. El plásmido e inserto tratados fueron transformados en células de *E. coli* Fusion Blue™ (Clontech, Mountain View, CA, EE.UU) según el protocolo del fabricante y colocados en placas LB suplementadas con 50 µg de ampicilina por ml. Después de incubación a 37°C durante toda la noche, las colonias fueron vistas crecer bajo selección en las placas de ampicilina LB. Diez colonias transformadas con el constructo P24DZF GH23 fueron cultivadas en el medio LB suplementado con 50 µg de

ampicilina por ml y el plásmido fue aislado utilizando un FASTPlasmid mini kit de 5Prime (5 PRIME GmbH, Königstrasse 4a, 22767 Hamburg, Alemania) según las instrucciones del fabricante.

5 [0304] Plásmidos aislados fueron secuenciados con cebadores de vector y para determinar un clon de expresión de plásmido representativo que fue libre de errores de PCR.

Caracterización de las secuencias genómicas de CBS 172.66 de *Aspergillus aculeatus* que codifican el polipéptido GH23

10 [0305] Secuenciación del ADN del clon genómico P24DZF GH23 de CBS172.66 de *Aspergillus aculeatus* fue realizada con un modelo de Applied Biosystems Model 3730xl Automated DNA Sequencer usando la versión 3.1 de química de terminador BIG-DYE™ (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, EE.UU) y estrategia de paseo con cebador. Datos de la secuencia de nucleótidos fueron escrutinados para calidad y todas las secuencias fueron comparadas una con la otra con asistencia de software PHRED/PHRAP (University of Washington, Seattle, WA, USA). La secuencia obtenida fue idéntica a la secuencia del JGI y se muestra en SEQ ID N.º: 1.

20 [0306] La secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos deducida del gen P24DZF GH23 de *Aspergillus aculeatus* se muestra en SEQ ID N.º: 1 y SEQ ID N.º: 2, respectivamente. La secuencia codificante es 862 bp incluyendo el codón de terminación y se interrumpe por un intrón único de 67 bp (nucleótidos 572 a 638). La proteína predicha codificada tiene 264 aminoácidos y se muestra en SEQ ID N.º: 2. Utilizando el programa SignalP (Nielsen et al., 1997, Protein Engineering 10: 1-6), un péptido señal de 19 residuos fue predicho. La proteína madura predicha contiene 245 aminoácidos.

25 [0307] La cepa MT3568 de *Aspergillus oryzae* fue usada para todos los experimentos. MT3568 de *Aspergillus oryzae* es un derivado interrumpido de amdS (acetamidasa) de *A. Oryzae* JaL355 (WO 2002/40694) donde la auxotrofia de pyrG fue restaurada en el proceso de eliminación del gen amdS de *A. Oryzae*. Protoplastos MT3568 de *A. oryzae* fueron preparados según el método de patente europea, EP0238023, páginas 14-15. Protoplastos frescos MT3568 de *A. Oryzae* fueron preparados y transformados con el plásmido P24DZF GH23. ADN plásmido del procedimiento mini prep fue usado para transformar MT3568 de *A. Oryzae*.

35 [0308] Seis μ l que contienen aproximadamente 3.0 μ g de ADN total fueron usados para la transformación. El ADN fue suavemente añadido a 100 μ l de protoplastos MT3568 de *A. Oryzae* y 250 μ l de PEG 4000 al 60% (Sigma-Aldrich cat. N° 95904). El 60% de PEG 4000 (p/v) fue preparado de la siguiente manera: polvo PEG 4000 fue disuelto en H₂O destilado doble y luego calentado durante 10-20 segundos en un horno microondas a 800 vatios hasta disolverse. La solución disuelta fue enfriada hasta temperatura ambiente y luego ajustada con solución CaCl₂ y solución Tris-HCl (pH 7.5) hasta una concentración final de 10mM de cada una. Después de añadir la solución de PEG 4000 al 60%, el tubo fue suavemente mezclado e incubado a 37°C durante 30 minutos. La mezcla se añadió a 6 ml de agar blando con 10 mM acetamida y se colocó en placas de COVE-sorbitol con 10 mM de acetamida.

45 [0309] Las placas fueron incubadas a 37°C durante 3 o más días y luego se movieron a 26°C durante dos días. Esporas de 8 colonias individuales fueron escogidas primero sumergiendo un eje de inoculación blanco de 10 μ l (Nunc A/S, Dinamarca) en una solución de TWEEN® 80 al 0.1%, contactando la colonia de esporulación en la placa de selección, y reestriando con el eje sobre placas de sorbitol COVE recién recibidas conteniendo 10 mM de acetamida. Después de 5 días a 26°C, las esporas de las colonias reestriadas fueron usadas para inocular una placa profunda de 96 pocillos (NUNC, cat. N° 260251, Thermoscientific, USA). Los pocillos de la placa profunda contenida 500 μ l de bien YP + 2% glucosa o medios DAP4C. La placa inoculada fue sellada con cinta permeable a los gases (89009-656, VWR.com). Placas fueron incubadas fijas a 30 C durante 5 días. Expresión fue verificada por análisis de 20 μ l de fluido de cultivo cosechado en SDS-PAGE utilizando un NUPAGE® gel Bis-Tris al 10% (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU) y coloración con azul Coomassie. Un transformante fue seleccionado para otro trabajo y designado EXP03899 de *A. Oryzae*.

55 [0310] Esporas de EXP03899 fueron inoculadas en ambos medios de glucosa YP+2% y medio DAP-4C-1 (100mls en matraz de agitación de Erlenmeyer de 500ml con deflectores). Los cultivos fueron incubados a 26°C y 150 r.p.m., 3 días y si fuera necesario 4 días. Un gel SDS fue ejecutado como anteriormente para probar la cantidad de proteína.

Prueba de placas para la actividad de lisozima

60

[0311] Un ensayo de manchas fue realizado con Goma xantana, a pH 5, 7 y 8 como se describe en la sección ensayo de placas de lisozima.

65 [0312] Una solución de agarosa al 1.5% (Invitrogen cat. 15510-027, calidad de electroforesis) fue preparada en los siguientes tampones:

pH ~5 - en agua
 pH ~7 - en 0.02M de fosfato potásico
 pH 7 PH ~8 - en 0.02M de fosfato potásico pH 8

- 5 [0313] La agarosa fue sometida a autoclave durante 20 minutos a 121°C. 0,5% de goma xantana (Sigma G1253) fue disuelta en la agarosa derretida al 1,5 % y la mezcla vertida en placas petri. Cuando las placas fueron preparadas, los pocillos de aplicación de muestra fueron hechos con una punta de pipeta P-1000 (corte a un diámetro de 3 mm) fijada a una línea de vacío.
- 10 [0314] 20ul del fluido de cultivo de EXP03899 fue depositado en los pocillos de aplicación e incubado a 37°C durante la noche. Muestras con actividad de lisozima fueron observadas por zonas de aclaramiento donde el detrito celular en la goma xantana fue observado. Fluidos de cultivo de EXP03899 presentaron esta zona de aclaramiento mientras el huésped MT3568 de transformación no transformado de *Aspergillus oryzae* no produjo una zona de aclaramiento perceptible. El fluido de cultivo restante EXP03899 fue filtrado a través de un filtro superior Fast PES Bottle con un corte de 0,22 µm y almacenado en partes alícuotas a -20°C hasta un uso posterior.

Ejemplo 3: clonación y caracterización de dos genes codificantes de lisozima GH24 de *Acremonium alkalophilum* (SEQ ID NOs: 4 y 6)

- 20 [0315] La información de la secuencia genómica fue generada por el U.S. Department of Energy Joint Genome Institute (JGI). Según Central Bureau vor Schimmelkulture, *Acremonium alkalophilum* CBS 114.92 fue aislada por A. Yoneda en 1984 del lodo de compost de heces de cerdo cerca del lago Tsukui, Japón. Un conjunto preliminar del genoma fue descargado de JGI y analizado utilizando el Pedant-ProTM Sequence Analysis Suite (Biomax Informatics AG, Martinsried, Alemania). Modelos genéticos construidos por el software fueron usados como un punto de partida para detectar los homólogos GH24 en el genoma. Modelos de gen más precisos fueron construidos manualmente utilizando secuencias de proteína GH24 conocidas múltiples como una guía.
- 25 [0316] *Acremonium alkalophilum* CBS 114.92 fue propagado en agar Horikoshi, pH9 durante 7 días a 30 C. Micelios fueron cosechados directamente desde la placa y ADN fue aislado según el equipo FastDNA SPIN Kit for Soil (www.mpbio.com). El ADN fue eluido en 100 ul 10mM tampón TRIS, 0.1 mM EDTA, pH 7,5 y almacenado a 4 C hasta el uso.
- 30 [0317] Los pares de cebadores oligonucleótidos sintéticos mostrados en la tabla 2 a continuación fueron diseñados para amplificar por PCR el gen P242MS GH24 de CBS114.92 de *A. Alkalophilum* o el gen P244A7 GH24 del ADN genómico de *A. Alkalophilum* descrito en el ejemplo 2 arriba.

Tabla 2: cebadores usados para amplificación por PCR de GH24 y GH25

40

Gen GH24	Cebador directo específico	Cebador inverso específico
<i>A. alkalophilum</i> CBS114.92 GH24 P242MS	F- P242MS 5'-ACACAAC TGGGGATCCACC ATGGCCAAGTCTCTACCCT - 3' (SEQ ID NO: 11)	R- P242MS 5'-AGATCTCGAGAAGCTT ACTAAGAACAA GCAGGGAGGGC -3' (SEQ ID NO: 12)
<i>A. alkalophilum</i> CBS114.92 GH24 P244A7	F- P244A7 5'-ACACAAC TGGGGATCCACC ATGGTCTCTTTCAAGCAGCT C-3' (SEQ ID NO: 13)	R- P244A7 5'-AGATCTCGAGAAGCTT ACTAAGAGCAA GCAGGCAGAGC -3' (SEQ ID NO: 14)

- 45 [0318] Las letras en negrita representan la secuencia codificante. La secuencia subrayada es homóloga a los sitios de inserción de pDau109.
- [0319] La secuenciación del ADN de los clones genómicos GH24 de CBS114.92 de *Acremonium alkalophilum* fue realizada con un secuenciador de ADN automatizado de Applied Biosystems modelo 3730xl usando la química de terminador BIG-DYE™ versión 3.1 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, EE.UU) y estrategia de paseo con cebador. Los datos de las secuencias de nucleótidos fueron escrutinados para calidad y todas las secuencias fueron comparadas una con otra con asistencia del software PHRED/PHRAP (University of Washington, Seattle, WA, USA). Las secuencias obtenidas fueron idénticas a las secuencias del JGI.

Gen P242MS GH24

55

[0320] La secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos deducida del gen GH24 de *Acremonium alkalophilum* se muestran en SEQ ID N.º: 3 y SEQ ID N.º: 4, respectivamente. La secuencia codificante es de 628 bp incluyendo el codón de terminación y se interrumpe por un intrón único de 67 bp (nucleótidos 268 a 334). La proteína predicha codificada es de 186 aminoácidos. Utilizando el programa SignalP (Nielsen et al., 1997, Protein Engineering 10: 1-6), un péptido señal de 20 residuos fue predicho. La proteína madura predicha contiene 166 aminoácidos.

Gen P244A7 GH24

[0321] La secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos deducida del gen P244A7 GH24 de *Acremonium alkalophilum* se muestran en SEQ ID N.º: 5 y SEQ ID N.º: 6, respectivamente. La secuencia codificante es de 782 bp con el codón de terminación y se interrumpe por dos intrones de 81 bp (nucleótidos 134 a 214) y 170bp (nucleótidos 346-515). La proteína predicha codificada tiene 176 aminoácidos. Utilizando el programa SignalP (Nielsen et al., 1997, Protein Engineering 10: 1-6), un péptido señal de 19 residuos fue predicho. La proteína madura predicha contiene 157 aminoácidos.

[0322] Los plásmidos para P242MS y P244A7 producidos y transformados en *Aspergillus oryzae* como en el ejemplo 2. Transformantes con fluidos de cultivo que produjeron producto proteínico recombinante fueron identificados por SDS-PAGE como en el ejemplo 2 y designados: EXP03865, en el caso de P242MS, y EXP03890 en el caso de P244A7. Fluidos de cultivo de EXP03865 y EXP03890 fermentados en medios de glucosa YP+ 2% y DAP4C fueron manchados en las placas de detrito celular bacteriano de xantano. Se identificó que DAP4C produjo la mejor expresión de la proteína mientras YP + 2% glucosa produjo la mejor expresión para EXP03890 tanto en el análisis de SDS-PAGE como en la actividad de ensayo de manchas.

Ejemplo 4: RDA (ensayos de difusión Radial)

[0323] Inicialmente, la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de cultivo y fracciones purificadas con las lisozimas recombinantemente expresadas fue confirmada utilizando un RDA como se describe previamente por Lehrer et al. (Lehrer RI, Rosenman M, Harwig SS et al. (1991), "Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides", J Immunol Methods, 137:167-73), con diferentes modificaciones. En resumen, 30 mL de 1/10 caldo Mueller-Hinton derretido (MHB) (Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) con 1% agarosa fue enfriado a 42°C, suplementado a 5.0×10^5 cfu/mL con *S. Carnosus* ATCC 51365 o *E. Coli* DSM682 (ATCC 10536) y fue vertido en una placa Omnitray (NUNC) de pocillo individual. La placa omnitray fue cubierta con una placa TSP (NUNC) y dejada solidificar. Después de 1 h, la placa TSP fue quitada; dejando 96 pocillos de 1-mm en los que 10 µL del compuesto de interés podrían ser evaluados.

[0324] 10 µl de la solución de prueba son manchados por pocillo y las placas son incubadas O/N a 37°C. Al día siguiente, las zonas de aclaramiento no indicaron ningún crecimiento de bacterias de prueba ni por tanto de actividad antimicrobiana. Las zonas de aclaramiento fueron visualizadas por la coloración con MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro, un tertrazol amarillo), que se reduce a formazán púrpura en células vivas (Mosmann, Tim (1983), "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays", Journal of Immunological Methods 65 (1-2): 55-63). Esta coloración proporciona una coloración oscura de células vivas y ninguna coloración de las zonas de aclaramiento sin células vivas.

[0325] La lisozima GH25 de *Aspergillus fumigatus* (preparada como se describe en Korczynska et al, Acta Cryst. (2010) F66,973-977) fue incluida en la prueba como una referencia. Las muestras purificadas en la tabla 3 a continuación han sido evaluadas en el ensayo RDA.

Tabla 3: Ensayo de difusión radial de lisozima GH24

Lisozima	Conc. madre.	Dilución 0.7 ug/ul	Dilución 0.35 ug/ul
<i>A.alcalophilum</i> GH24 SEQ ID NO: 6	1.4ug/ul	37.5ul enz. + 37.5ul agua	18.8ul enz. + 56.2ul agua
<i>A. alcalophilum</i> GH25 SEQ ID NO: 8	0.77ug/ul	68.2ul enz. + 6.8ul agua	34.1ul enz. + 40.9ul agua

<i>A.fumigatus</i> (referencia)	GH25	12.2ug/ul	4.3ul enz. + 70.6ul agua	2.2ul enz. + 72.8ul agua
------------------------------------	------	-----------	--------------------------	--------------------------

Medición de zonas de aclaramiento

5 [0326] El experimento fue realizado por triplicado con todo dando como resultado las mismas zonas de aclaramiento/zonas de inhibición medidas, véase figura 1. La Tabla 4 a continuación muestra las zonas de aclaramiento en mm

Tabla 4: Zonas de aclaramiento antimicrobiano de Lizozima GH24 contra *Staphylococcus carnosus* y *Escherichia coli*.

	0.7 µg/µl <i>S. carnosus</i>	0.35 µg/µl <i>S. carnosus</i>	0.7 µg/µl <i>E. coli</i>	0.35 µg/µl <i>E. coli</i>
<i>A.alcalophilum</i> GH24 SEQ ID NO: 6	12	10	16	14
<i>A. alcalophilum</i> GH25 SEQ ID NO: 8	Débil	Débil	8 (turbio)	6 (turbio)
<i>A.fumigatus</i> GH25 (referencia)	11	10	10	8

10 [0327] La lizozima purificada teniendo SEQ ID N.º: 6 mostró actividad antimicrobiana contra las células viables de las bacterias gram positivas *Staphylococcus carnosus* y las bacterias gram negativas *Escherichia coli*.

15 [0328] La actividad antimicrobiana no está presente en sobrenadantes del cultivo desde el huésped de producción de *Aspergillus* no transformado (resultados no mostrados).

20 [0329] Zonas de aclaramiento grandes con bordes no definidos fueron observadas rodeando la zona de aplicación para GH24 de *A. alcalophilum* (SEQ ID N.º: 6). El experimento indica que la lizozima de *A. alcalophilum* (SEQ ID N.º: 6) y la lizozima de referencia GH25 de *Aspergillus fumigatus* tienen actividad diferente y especificidad contra las dos bacterias evaluadas en este ejemplo.

Ejemplo 5: ensayo de turbidez

25 [0330] La actividad de lizozima fue determinada por la medición de la reducción (caída) en la absorbencia/densidad óptica de una solución de *Micrococcus lysodeikticus* resuspendida ATTC n° 4698 (Sigma-Aldrich M3770) o *Exiguobacterium undae* (DSM14481) medida en un espectrofotómetro a 540 nm.

Preparación de sustrato de *Micrococcus lysodeikticus*

30 [0331] Antes de usar las células fueron resuspendidas en el tampón de fosfato - ácido cítrico pH 6.5 hasta una concentración de 0.5 mg células/ml y la densidad óptica (OD) a 540 nm fue medida. La suspensión celular fue luego ajustada de modo que la concentración celular igualó una OD₅₄₀ = 1.0. La suspensión celular ajustada fue luego almacenada en frío antes de usar. Células resuspendidas fueron usadas dentro de 35 4 horas.

Preparación de tampón fosfato - ácido cítrico pH 6.5

40 [0332] 29 mL 0.1 M ácido cítrico fue mezclado con 61 mL 0.2 M Na₂HPO₄, y el pH fue ajustado con HCl o NaOH a pH 6.5.

Preparación de células secadas de *Exiguobacterium undae* (el sustrato)

45 [0333] Un cultivo de *E. undae* (DSM14481) fue crecido en 100 mL de medio LB (Fluka 51208,25 g/L) en un matraz de agitación de 500 mL a 30°C, 250 r.p.m. durante toda la noche. El cultivo durante toda la noche fue luego centrifugado a 20°C y 5000g durante 10 minutos, y el granulado fue lavado dos veces en agua milliQ estéril, y resuspendido en agua Milli-Q. Las células lavadas fueron centrifugadas durante 1 minuto a 13000 r.p.m. y en lo posible el sobrenadante fue decantado. Las células lavadas fueron secadas en un vacío

centrifugo durante 1 hora. El granulado celular fue resuspendido en el tampón de fosfato - ácido cítrico pH 6.5 de modo que la densidad óptica (OD) a 540nm = 1.

Medición de actividad antimicrobiana de lisozima en el ensayo de turbidez

5

[0334] La muestra de lisozima para ser medida fue diluida a una concentración de 100-200 mg de proteína enzimática/L en tampón fosfato - ácido cítrico pH 6.5, y mantenida en hielo hasta el uso. En una placa de microtitulación (NUNC) de 96 pocillos 200µL del sustrato se añadió a cada pocillo, y la placa fue incubada a 25°C o 37°C durante 5 minutos en un lector de microplacas VERSAmax (Molecular Devices). Después de la incubación, la absorbancia de cada pocillo fue medida a 540 nm (valor inicial). Para iniciar la medición de la actividad, 20 µL de la muestra de lisozima diluida se añadió a cada sustrato (200 µL) y la medición cinética de absorbancia a 540 nm fue iniciada durante mínimo 30 minutos hasta 24 horas a 25°C o 37°C. La absorbancia medida a 540 nm fue monitoreada para cada pocillo y a lo largo del tiempo se ve una caída en la absorbancia si la lisozima tiene actividad de lisozima.

10

15

[0335] La lisozima GH25 de *Aspergillus fumigatus* (Korczynska et al (2010) supra.) fue incluida en la prueba como una referencia y los resultados se muestran en la tabla 5 a continuación.

Tabla 5: Actividad de lisozima de lisozimas GH25 contra el *Micrococcus lysodeikticus* y *Exiguobacterium undea* como se mide por la caída de la densidad óptica

20

	Micrococcus lysodeikticus	Exiguobacterium undae	
Temperatura	37°C	25°C	37°C
<i>A.alcalophilum</i> GH24 (SEQ ID NO: 4)	NT	-	-
<i>A.alcalophilum</i> GH24 (SEQ ID NO: 6)	+++	+	+
<i>A.fumigatus</i> GH25 (referencia)	+	+++	+++
NT significa no testado - significa ningún efecto + significa efecto pequeño ++ significa efecto medio +++ significa efecto grande			

Ejemplo 6: expresión de proteína GH24 P242MS y proteína GH24 P244A7 en *Aspergillus oryzae*

25

[0336] Los constructos que comprenden el gen de lisozima pertinente fueron usados para construir vectores de expresión para *Aspergillus*. Los vectores de expresión de *Aspergillus* consisten en un casete de expresión basado en el promotor de amilasa II neutra de *Aspergillus niger* fusionado a la secuencia líder no traducida de triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans* (Pna2/tpi) y el terminador de amiloglicosidasa de *Aspergillus niger* (Tamg). También estaba presente en el plásmido el marcador *amdS* selectivo de *Aspergillus* de *Aspergillus nidulans* que permite el crecimiento en la acetamida como única fuente de nitrógeno. Los plásmidos de expresión fueron transformados en *Aspergillus* como se describe en el ejemplo 3. Para cada uno de los constructos 10-20 cepas fueron aisladas, purificadas y cultivadas en frascos de agitación.

30

Ejemplo 7: purificación de proteína GH24 P242MS y proteína GH24 P244A7 en *Aspergillus oryzae*

35

Purificación de proteína GH24 de P242MS

[0337] El sobrenadante de fermentación con la lisozima fue filtrado a través de un filtro superior Fast PES Bottle con un corte de 0.22 µm. El pH fue ajustado a 7.5 con 0.1 M NaOH y la solución resultante fue concentrada (volumen reducido por un factor de 8) en una unidad de filtración Ultra (Sartorius) con una membrana cortada de 5 kDa.

40

[0338] Después de pretratamiento, aproximadamente 55 ml de la solución que contiene lisozima fue purificado por cromatografía en Q Sepharose, aproximadamente 50 ml en una columna XK26, que usa como tampón A 50 mM TRIS pH 7.5, y como tampón B 50 mM TRIS + 1 M pH de NaCl 7.5. Las fracciones desde la

45

columna fueron agrupadas basadas en el cromatograma (absorción a 280 y 254 nm) y análisis SDS-PAGE. Las fracciones agrupadas fueron cambiadas de tampón en 50 mM Na-acetato, pH 5.5 y concentradas en un Vivacell 250 ml, 5 kDa filtro PES.

5 [0339] El peso molecular, como estimado de SDS-PAGE, fue aproximadamente 20 kDa y la pureza fue > 95%.

Purificación de proteína P244A7 GH24

10 [0340] El sobrenadante de fermentación con la lisozima fue filtrado a través de un sándwich de cuatro filtros de microfibra de vidrio de Whatman (2.7, 1.6, 1.2 y 0.7 micrómetros) y luego a través de un filtro superior de Fast PES Bottle con un corte de 0,22 µm. El pH fue ajustado a 4.5 con 10% ácido acético. Después del ajuste de pH la solución se volvió un poco turbia y se quitó por filtración a través de un filtro superior de Fast PES Bottle con un corte de 0,22 µm.

15 [0341] Después del pretratamiento aproximadamente 970 ml de la solución que contiene lisozima fue purificado por cromatografía en la SP Sepharose, aproximadamente 50 ml en una columna XK26, usando como tampón A 50 mM Na-acetato pH 4,5, y como tampón B 50 mM Na-acetato + 1 M NaCl pH 4,5. Las fracciones desde la columna fueron agrupadas basadas en el cromatograma (absorción a 280 y 254 nm) y análisis de SDS-PAGE. Las fracciones agrupadas fueron cambiadas de tampón en 50 mM Na-acetato, pH 5.5 y concentradas usando filtros giratorios de Amicon con un corte de 10 kDa.

20 [0342] El peso molecular, como se estimó de SDS-PAGE, fue aproximadamente 20 kDa y la pureza fue > 90%.

25

LISTADO DE SECUENCIAS

[0343]

30 <110> Novozymes A/S

<120> POLYPEPTIDES HAVING LYSOZYME ACTIVITY AND POLYNUCLEOTIDES ENCODING SAME

<130> 12166-EP-EPA

35

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

40

<210> 1
<211> 862
<212> DNA
<213> Aspergillus aculeatus

45

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(571)

50

<220>
<221> sig_peptide
<222> (1)..(57)

55

<220>
<221> CDS
<222> (639)..(859)

<400> 1

ES 2 631 605 T3

atg	cag	ttg	aac	aac	ttc	ctt	ctg	gcc	gcc	gcc	act	ctg	gtc	ggc	ctc	48
Met	Gln	Leu	Asn	Asn	Phe	Leu	Leu	Ala	Ala	Ala	Thr	Leu	Val	Gly	Leu	
1			5					10					15			
tcc	gcc	gct	gtc	ccc	atg	ggc	agt	cgg	act	aag	aac	ctg	gcc	acc	cgc	96
Ser	Ala	Ala	Val	Pro	Met	Gly	Ser	Arg	Thr	Lys	Asn	Leu	Ala	Thr	Arg	
			20					25					30			
gcc	acc	aat	gcc	gtg	gtc	agc	gtc	agc	agc	ctg	gcc	gcg	acc	acg	ctc	144
Ala	Thr	Asn	Ala	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Leu	Ala	Ala	Thr	Thr	Leu	
		35					40					45				
aag	gac	aac	gac	ggc	agc	gga	gcc	gga	cag	gat	gtc	tac	acc	ttc	cac	192
Lys	Asp	Asn	Asp	Gly	Ser	Gly	Ala	Gly	Gln	Asp	Val	Tyr	Thr	Phe	His	
	50					55					60					
acc	gga	gac	ggc	agc	gtc	gcc	gac	ggc	tgg	ccc	gcc	cag	tcc	agc	tgg	240
Thr	Gly	Asp	Gly	Ser	Val	Ala	Asp	Gly	Trp	Pro	Ala	Gln	Ser	Ser	Trp	
65					70					75					80	
gtc	tcc	ttc	gac	gac	atg	tgg	aag	gcc	aac	aag	ccc	acc	atc	atg	gag	288
Val	Ser	Phe	Asp	Asp	Met	Trp	Lys	Ala	Asn	Lys	Pro	Thr	Ile	Met	Glu	
			85					90						95		
tcg	tgc	acc	cag	ttc	ggc	gtg	ccc	aac	aac	tcg	gcc	aac	gag	acc	cag	336
Ser	Cys	Thr	Gln	Phe	Gly	Val	Pro	Asn	Asn	Ser	Ala	Asn	Glu	Thr	Gln	
			100					105					110			
aac	ctg	tac	gac	gcg	atc	cag	cag	gtg	gcc	aag	gag	tcc	cac	ctc	gac	384
Asn	Leu	Tyr	Asp	Ala	Ile	Gln	Gln	Val	Ala	Lys	Glu	Ser	His	Leu	Asp	
		115					120					125				

ES 2 631 605 T3

cac cgg ttc atc ctg gcc atc atc atg cag gaa tcc aag ggc tgc gtc	432
His Arg Phe Ile Leu Ala Ile Ile Met Gln Glu Ser Lys Gly Cys Val	
130 135 140	
cgc gtg cac acc acc aac tac ggc gtc cgc aac ccg ggc ctc atg cag	480
Arg Val His Thr Thr Asn Tyr Gly Val Arg Asn Pro Gly Leu Met Gln	
145 150 155 160	
gat cat gat ggc gcc ggc act tgc aac gac aac ggg gtg gtc cag aac	528
Asp His Asp Gly Ala Gly Thr Cys Asn Asp Asn Gly Val Val Gln Asn	
165 170 175	
ccg tgc ccc aag aac gag atc ctc cag atg gtt cgc gat ggg g	571
Pro Cys Pro Lys Asn Glu Ile Leu Gln Met Val Arg Asp Gly	
180 185 190	
gtgagtgtcc cttccaaccc tcccaatctc ctttcagcgc agacactaat ccctctctct	631
cacacag cc atc gga acc gcc gcc ggc gac gga ctg gcc agt ctg atc	679
Ala Ile Gly Thr Ala Ala Gly Asp Gly Leu Ala Ser Leu Ile	
195 200	
gac cag cag ggc aag acg gac gtc tcc ggc ttt tac cgc gcc gcc cgc	727
Asp Gln Gln Gly Lys Thr Asp Val Ser Gly Phe Tyr Arg Ala Ala Arg	
205 210 215 220	
ctg tac aac tcg ggc tcc atc tcc gac gcc tcc aac ctg aac gtc ggc	775
Leu Tyr Asn Ser Gly Ser Ile Ser Asp Ala Ser Asn Leu Asn Val Gly	
225 230 235	
gtc ggc acc gcc tgc tac gcc acc gat gtt gcc aac cgg ctc acc ggc	823
Val Gly Thr Ala Cys Tyr Ala Thr Asp Val Ala Asn Arg Leu Thr Gly	
240 245 250	
tgg gtc aac gcc gcc tcc aag tgc acc ctg agc gca tag	862
Trp Val Asn Ala Ala Ser Lys Cys Thr Leu Ser Ala	
255 260	

<210> 2

<211> 264

5 <212> PRT

<213> Aspergillus aculeatus

<400> 2

ES 2 631 605 T3

Met Gln Leu Asn Asn Phe Leu Leu Ala Ala Ala Thr Leu Val Gly Leu
1 5 10 15

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

Ala Thr Asn Ala Val Val Ser Val Ser Ser Leu Ala Ala Thr Thr Leu
35 40 45

Lys Asp Asn Asp Gly Ser Gly Ala Gly Gln Asp Val Tyr Thr Phe His
50 55 60
Thr Gly Asp Gly Ser Val Ala Asp Gly Trp Pro Ala Gln Ser Ser Trp
65 70 75 80

Val Ser Phe Asp Asp Met Trp Lys Ala Asn Lys Pro Thr Ile Met Glu
85 90 95

Ser Cys Thr Gln Phe Gly Val Pro Asn Asn Ser Ala Asn Glu Thr Gln
100 105 110

Asn Leu Tyr Asp Ala Ile Gln Gln Val Ala Lys Glu Ser His Leu Asp
115 120 125

His Arg Phe Ile Leu Ala Ile Ile Met Gln Glu Ser Lys Gly Cys Val
130 135 140

Arg Val His Thr Thr Asn Tyr Gly Val Arg Asn Pro Gly Leu Met Gln
145 150 155 160

Asp His Asp Gly Ala Gly Thr Cys Asn Asp Asn Gly Val Val Gln Asn
165 170 175

Pro Cys Pro Lys Asn Glu Ile Leu Gln Met Val Arg Asp Gly Ala Ile
180 185 190

Gly Thr Ala Ala Gly Asp Gly Leu Ala Ser Leu Ile Asp Gln Gln Gly
195 200 205

Lys Thr Asp Val Ser Gly Phe Tyr Arg Ala Ala Arg Leu Tyr Asn Ser
210 215 220

Gly Ser Ile Ser Asp Ala Ser Asn Leu Asn Val Gly Val Gly Thr Ala
225 230 235 240

Cys Tyr Ala Thr Asp Val Ala Asn Arg Leu Thr Gly Trp Val Asn Ala
245 250 255

Ala Ser Lys Cys Thr Leu Ser Ala
260

ES 2 631 605 T3

<210> 3
<211> 628
<212> DNA
5 <213> Acremonium alcalophilum

<220>
<221> CDS
10 <222> (1)..(267)

<220>
<221> six_peptide
15 <222> (1)..(60)

<220>
<221> CDS
<222> (335)..(625)

20 <400> 3

ES 2 631 605 T3

atg gcc aag gtc tct acc ctc acc atc gca ctc ctc acc atg gcc tcc 48
 Met Ala Lys Val Ser Thr Leu Thr Ile Ala Leu Leu Thr Met Ala Ser
 1 5 10 15

cag gct cgc gcg cag tgc gtc ggt ccc gag gtt aac agc gcc agc atc 96
 Gln Ala Arg Ala Gln Cys Val Gly Pro Glu Val Asn Ser Ala Ser Ile
 20 25 30

aac ctc atc aaa gag ttt gag ggc tgg tat ccc gac atc tac gtc gat 144
 Asn Leu Ile Lys Glu Phe Glu Gly Trp Tyr Pro Asp Ile Tyr Val Asp
 35 40 45

ccc gcc ggc tat ccg acc gtc ggc tac ggc cac ctc tgc tcc gac tcg 192
 Pro Ala Gly Tyr Pro Thr Val Gly Tyr Gly His Leu Cys Ser Asp Ser
 50 55 60

agc tgt tcc gac gtg tcg tac tcc att ccg ttg tcc gag gcg gac ggc 240
 Ser Cys Ser Asp Val Ser Tyr Ser Ile Pro Leu Ser Glu Ala Asp Gly
 65 70 75 80

gag aat ctc ctc cgt gac gac att acc gtgcggtggc cctttcttct 287
 Glu Asn Leu Leu Arg Asp Asp Ile Thr
 85

ttccactttt cccaagaaga agaaggagaa attactaatg tccaaag aac ttc caa 343
 Asn Phe Gln
 90

aac tgc atc acc tgg cag acc gcc tcg tcc gtc gtc ctc aac gcc aac 391
 Asn Cys Ile Thr Trp Gln Thr Ala Ser Ser Val Val Leu Asn Ala Asn
 95 100 105

cag tat ggc gcc ctc gtc tcg tgg gcc ttc aac gta ggc tgt ggc gcc 439
 Gln Tyr Gly Ala Leu Val Ser Trp Ala Phe Asn Val Gly Cys Gly Ala
 110 115 120

tct gag tct tcg tcg ctg atc gcc cgc ctc aac gcc ggc gag gac ccc 487
 Ser Glu Ser Ser Ser Leu Ile Ala Arg Leu Asn Ala Gly Glu Asp Pro
 125 130 135 140

aac acc gtc gcc gag gag gag ctg ccg cgg tgg aac cag ggt ggc ggc 535
 Asn Thr Val Ala Glu Glu Glu Leu Pro Arg Trp Asn Gln Gly Gly Gly
 145 150 155

cag gtc ctc ccc ggt ctt gtc cgt cgt cgc gcc gcc gag gtc gag ctg 583
 Gln Val Leu Pro Gly Leu Val Arg Arg Arg Ala Ala Glu Val Glu Leu
 160 165 170

cac cag att cct act gac gtg gcc gcc ctc cct gct tgt tct tag 628
 His Gln Ile Pro Thr Asp Val Ala Ala Leu Pro Ala Cys Ser
 175 180 185

5 <210> 4
 <211> 186
 <212> PRT
 <213> Acremonium alcalophilum
 <400> 4

ES 2 631 605 T3

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

Gln Ala Arg Ala Gln Cys Val Gly Pro Glu Val Asn Ser Ala Ser Ile
 20 25 30

Asn Leu Ile Lys Glu Phe Glu Gly Trp Tyr Pro Asp Ile Tyr Val Asp
 35 40 45

Pro Ala Gly Tyr Pro Thr Val Gly Tyr Gly His Leu Cys Ser Asp Ser
 50 55 60

Ser Cys Ser Asp Val Ser Tyr Ser Ile Pro Leu Ser Glu Ala Asp Gly
 65 70 75 80

Glu Asn Leu Leu Arg Asp Asp Ile Thr Asn Phe Gln Asn Cys Ile Thr
 85 90 95

Trp Gln Thr Ala Ser Ser Val Val Leu Asn Ala Asn Gln Tyr Gly Ala
 100 105 110

Leu Val Ser Trp Ala Phe Asn Val Gly Cys Gly Ala Ser Glu Ser Ser
 115 120 125

Ser Leu Ile Ala Arg Leu Asn Ala Gly Glu Asp Pro Asn Thr Val Ala
 130 135 140

Glu Glu Glu Leu Pro Arg Trp Asn Gln Gly Gly Gly Gln Val Leu Pro
 145 150 155 160

Gly Leu Val Arg Arg Arg Ala Ala Glu Val Glu Leu His Gln Ile Pro
 165 170 175

Thr Asp Val Ala Ala Leu Pro Ala Cys Ser
 180 185

- <210> 5
- <211> 782
- 5 <212> DNA
- <213> Acremonium alcalophilum
- <220>
- <221> CDS
- 10 <222> (1)..(133)
- <220>
- <221> six_peptide
- <222> (1)..(57)
- 15 <220>
- <221> CDS
- <222> (215)..(345)
- 20 <220>
- <221> CDS
- <222> (516)..(779)

ES 2 631 605 T3

<400> 5
atg gtc tct ttc aag cag ctc gcc ctc ctg gca ctg ggc gcc gtc caa 48
Met Val Ser Phe Lys Gln Leu Ala Leu Leu Ala Leu Gly Ala Val Gln
1 5 10 15
gta cag gcg cag tgc gtc ggc ccg gct atc aat tcc gcg gct ctt aac 96
Val Gln Ala Gln Cys Val Gly Pro Ala Ile Asn Ser Ala Ala Leu Asn
20 25 30
ctc atc aag gag ttt gag gga tgg agg ccc aac att t gtgcggtccc 143
Leu Ile Lys Glu Phe Glu Gly Trp Arg Pro Asn Ile
35 40
ttctacgtta catcaccag ttccttggt attcagacat tatttctata ttctggcta 203
acactgtaaa g ac cgc gac ccc gtc ggc ctc ccc acc gtc gga tac ggc 252
Tyr Arg Asp Pro Val Gly Leu Pro Thr Val Gly Tyr Gly
45 50 55
cac ctc tgc cgc gac tcg agc tgc tct gac gtc cct tac cca att ccc 300
His Leu Cys Arg Asp Ser Ser Cys Ser Asp Val Pro Tyr Pro Ile Pro
60 65 70
ctg tcc gtt gcc aac ggc gag cgt ctc ctt cgg agc gac cta gcg 345
Leu Ser Val Ala Asn Gly Glu Arg Leu Leu Arg Ser Asp Leu Ala
75 80 85
gtgagtctat cccctttgca cttcataaaa cgtcgccttc tctggtgtca ttctacctgg 405
acagcctccc cctattttctc tcttctatct tttcttcttt cccgttctgc aagcttgacc 465
cctgaccaac catatccacc cagacctacc agaactgcat cacgatgcag acg gcc 521
Thr Ala
90
tcg tcc gtc gtc ctg aat gcg aac cag tac ggc gcc ctg gtc agc tgg 569
Ser Ser Val Val Leu Asn Ala Asn Gln Tyr Gly Ala Leu Val Ser Trp
95 100 105
gcc ttc aac gtc ggc tgc ggc gcc acc agc acg tcg act ctg atc cgc 617
Ala Phe Asn Val Gly Cys Gly Ala Thr Ser Thr Ser Thr Leu Ile Arg
110 115 120
cgc ctc aac gcc gga gag agc ccc aac acc gtc gct gcc cag gag ctg 665
Arg Leu Asn Ala Gly Glu Ser Pro Asn Thr Val Ala Ala Gln Glu Leu
125 130 135
cct cgc tgg aac aag gct ggc ggc cag gtc ctg ccc ggc ctg gtg cgc 713
Pro Arg Trp Asn Lys Ala Gly Gly Gln Val Leu Pro Gly Leu Val Arg
140 145 150
cgc cgt gct gcc gag gta gag ctg cat cgt act tcc acc agt gtc cgt 761
Arg Arg Ala Ala Glu Val Glu Leu His Arg Thr Ser Thr Ser Val Arg
155 160 165 170
gct ctg cct gct tgc tct tag 782
Ala Leu Pro Ala Cys Ser
175

5 <210> 6
<211> 176
<212> PRT
<213> Acremonium alcalophilum

10 <400> 6

ES 2 631 605 T3

Met Val Ser Phe Lys Gln Leu Ala Leu Leu Ala Leu Gly Ala Val Gln
 1 5 10 15

Val Gln Ala Gln Cys Val Gly Pro Ala Ile Asn Ser Ala Ala Leu Asn
 20 25 30

Leu Ile Lys Glu Phe Glu Gly Trp Arg Pro Asn Ile Tyr Arg Asp Pro
 35 40 45

Val Gly Leu Pro Thr Val Gly Tyr Gly His Leu Cys Arg Asp Ser Ser
 50 55 60

Cys Ser Asp Val Pro Tyr Pro Ile Pro Leu Ser Val Ala Asn Gly Glu
 65 70 75 80

Arg Leu Leu Arg Ser Asp Leu Ala Thr Ala Ser Ser Val Val Leu Asn
 85 90 95

Ala Asn Gln Tyr Gly Ala Leu Val Ser Trp Ala Phe Asn Val Gly Cys
 100 105 110

Gly Ala Thr Ser Thr Ser Thr Leu Ile Arg Arg Leu Asn Ala Gly Glu
 115 120 125

Ser Pro Asn Thr Val Ala Ala Gln Glu Leu Pro Arg Trp Asn Lys Ala
 130 135 140

Gly Gly Gln Val Leu Pro Gly Leu Val Arg Arg Arg Ala Ala Glu Val
 145 150 155 160

Glu Leu His Arg Thr Ser Thr Ser Val Arg Ala Leu Pro Ala Cys Ser
 165 170 175

- <210> 7
- <211> 838
- 5 <212> DNA
- <213> Acremonium alcalophilum

- <220>
- <221> CDS
- 10 <222> (1)..(147)

- <220>
- <221> six_peptide
- <222> (1)..(57)
- 15
- <220>
- <221> CDS
- <222> (302)..(835)
- 20 <400> 7

ES 2 631 605 T3

atg aag ctt ctt ccc tcc ttg att ggc ctg gcc agt ctg gcg tcc ctc Met Lys Leu Leu Pro Ser Leu Ile Gly Leu Ala Ser Leu Ala Ser Leu 1 5 10 15	48
gcc gtc gcc cgg atc ccc ggc ttt gac att tcg ggc tgg caa ccg acc Ala Val Ala Arg Ile Pro Gly Phe Asp Ile Ser Gly Trp Gln Pro Thr 20 25 30	96
acc gac ttt gca agg gcg tat gct aat gga gat cgt ttc gtc tac atc Thr Asp Phe Ala Arg Ala Tyr Ala Asn Gly Asp Arg Phe Val Tyr Ile 35 40 45	144
aag gtacgttcaa ccttgccacc aagttgcgaa cccgagacaa gactgtgacc Lys	197
gcctcctttg ccctggggca gctcacgcac ccagcagcat cccatcccc ggccccccac	257
gtaccaccgg aaagctaaca tcaaccccct accactgcta ccag gcc acc gag ggc Ala Thr Glu Gly 50	313
acc aca ttc aag agc tcc gca ttc agc cgc cag tac acc ggc gca acg Thr Thr Phe Lys Ser Ser Ala Phe Ser Arg Gln Tyr Thr Gly Ala Thr 55 60 65	361
caa aac ggc ttc atc cgc ggc gcc tac cac ttc gcc cag ccc gcc gcg Gln Asn Gly Phe Ile Arg Gly Ala Tyr His Phe Ala Gln Pro Ala Ala 70 75 80 85	409
tcc tcg ggc gcc gcg cag gcg aga tac ttc gcc agc aac ggc ggc ggc Ser Ser Gly Ala Ala Gln Ala Arg Tyr Phe Ala Ser Asn Gly Gly Gly 90 95 100	457
tgg tcc aag gac ggc atc acc ctg ccc ggg gcg ctg gac atc gag tac Trp Ser Lys Asp Gly Ile Thr Leu Pro Gly Ala Leu Asp Ile Glu Tyr 105 110 115	505
aac ccc aac ggc gcc acc tgc tac ggc ctc tcg caa tcg gcc atg gtg Asn Pro Asn Gly Ala Thr Cys Tyr Gly Leu Ser Gln Ser Ala Met Val 120 125 130	553
aac tgg atc gag gac ttt gtc acc acc tac cac ggc atc acc tcc cgc Asn Trp Ile Glu Asp Phe Val Thr Thr Tyr His Gly Ile Thr Ser Arg 135 140 145	601
tgg ccc gtc atc tac acc acc acc gac tgg tgg acc cag tgc acc ggc Trp Pro Val Ile Tyr Thr Thr Thr Asp Trp Trp Thr Gln Cys Thr Gly 150 155 160 165	649
aac tcc aac cgc ttc gcg aac cgc tgc ccg ctg tgg atc gcc cgc tac Asn Ser Asn Arg Phe Ala Asn Arg Cys Pro Leu Trp Ile Ala Arg Tyr 170 175 180	697
gcc agc tcc gtc ggc act ctg ccc aat ggc tgg ggc ttt tac acc ttc Ala Ser Ser Val Gly Thr Leu Pro Asn Gly Trp Gly Phe Tyr Thr Phe 185 190 195	745
tgg cag tac aac gac aag tat cct cag ggc ggt gat tcg aac tgg ttc Trp Gln Tyr Asn Asp Lys Tyr Pro Gln Gly Gly Asp Ser Asn Trp Phe 200 205 210	793
aac ggc gat gcg tcg cgt ctc agg gct ctc gct aac gga gac taa Asn Gly Asp Ala Ser Arg Leu Arg Ala Leu Ala Asn Gly Asp 215 220 225	838

ES 2 631 605 T3

<210> 8
 <211> 227
 <212> PRT

5 <213> Acremonium alcalophilum

<400> 8

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

Ala Val Ala Arg Ile Pro Gly Phe Asp Ile Ser Gly Trp Gln Pro Thr
 20 25 30

Thr Asp Phe Ala Arg Ala Tyr Ala Asn Gly Asp Arg Phe Val Tyr Ile
 35 40 45

Lys Ala Thr Glu Gly Thr Thr Phe Lys Ser Ser Ala Phe Ser Arg Gln
 50 55 60

Tyr Thr Gly Ala Thr Gln Asn Gly Phe Ile Arg Gly Ala Tyr His Phe
 65 70 75 80

Ala Gln Pro Ala Ala Ser Ser Gly Ala Ala Gln Ala Arg Tyr Phe Ala
 85 90 95

Ser Asn Gly Gly Gly Trp Ser Lys Asp Gly Ile Thr Leu Pro Gly Ala
 100 105 110

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

Gln Ser Ala Met Val Asn Trp Ile Glu Asp Phe Val Thr Thr Tyr His
 130 135 140
 Gly Ile Thr Ser Arg Trp Pro Val Ile Tyr Thr Thr Asp Trp Trp
 145 150 155 160

Thr Gln Cys Thr Gly Asn Ser Asn Arg Phe Ala Asn Arg Cys Pro Leu
 165 170 175

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

Gly Phe Tyr Thr Phe Trp Gln Tyr Asn Asp Lys Tyr Pro Gln Gly Gly
 195 200 205

Asp Ser Asn Trp Phe Asn Gly Asp Ala Ser Arg Leu Arg Ala Leu Ala
 210 215 220

Asn Gly Asp
 225

ES 2 631 605 T3

<210> 9
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Primer F-P8EH
 <400> 9
 10 acacaactgg ggatccacca tgcagtgaa caactcctt ct 42
 <210> 10
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> Primer R-F8EH
 20
 <400> 10
 agatctcgag aagcttacta tgcgctcagg gtgcact 37
 25 <210> 11
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Primer F-P242MS
 <400> 11
 35 acacaactgg ggatccacca tggccaaggt ctctaccct 39
 <210> 12
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> Primer R-P242MS
 <400> 12
 45 agatctcgag aagcttacta agaacaagca gggagggc 38
 <210> 13
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> Primer F-P244A7
 55
 <400> 13
 acacaactgg ggatccacca tggctcttt caagcagctc 40
 60 <210> 14
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial
 65 <220>
 <223> Primer R-P244A7

ES 2 631 605 T3

<400> 14

5 agatctcgag aagcttacta agagcaagca ggcagagc 38

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polipéptido aislado que tiene actividad de lisozima, seleccionado del grupo que consiste en:
- (a) un polipéptido con al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100% de identidad de secuencia a los aminoácidos 20 a 176 de SEQ ID N.º: 6;
- 10 (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100% identidad de secuencia a la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 5;
- (c) un polipéptido codificado por un polinucleótido que se hibrida bajo condiciones de astringencia altas o muy altas con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 5, o el complemento en toda su longitud del mismo;
- 15 (d) una variante del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 6, que comprende una sustitución, delección, y/o inserción en una o más (por ejemplo; diferentes) posiciones, donde los polipéptidos difieren de no más de 17 aminoácidos de los aminoácidos 20 a 176 de SEQ ID N.º: 6; y
- (e) un fragmento del polipéptido de (a); (b), (c) o (d) que tiene actividad de lisozima.
- 20 2. Polipéptido según la reivindicación 1, que comprende o consiste en SEQ ID N.º: 6, el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 6 y/o aminoácidos 20 a 176 de SEQ ID N.º: 6.
3. Composición que comprende el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.
- 25 4. Composición de detergente que comprende uno o más componentes seleccionados del grupo que comprende tensioactivos, constructores, hidrótrofos, sistemas blanqueadores, polímeros, agentes de matizado de tejido, materiales complementarios, dispersantes, agentes de inhibición de transferencia de tinte, agentes blanqueadores fluorescentes, polímeros liberadores de suciedad y agentes antirredeposición.
- 30 5. Composición de detergente según la reivindicación 4, donde la composición comprende unas o más enzimas adicionales seleccionadas del grupo que comprende proteasas, amilasas, lipasas, cutinasas, celulasas, endoglucanasas, xiloglucanasas, pectinasas, pectina liasas, xantanasas, peroxidadas, haloperoxigenasas, catalasas y mananasas, o cualquier mezcla de las mismas.
- 35 6. Composición de pienso para animales que comprende el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.
7. Composición de pienso para animales según la reivindicación 6, que comprende además una o más amilasas; fitasas; xilanasas; galactanasas; alfa-galactosidasas; proteasas, fosfolipasas, beta-glucanasas, o cualquier mezcla de las mismas.
- 40 8. Aditivo de pienso que comprende al menos un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2; y al menos una vitamina liposoluble, y/o al menos una vitamina hidrosoluble, y/o al menos un oligoelemento.
- 45 9. Aditivo de pienso para animales según la reivindicación 8, que comprende además una o más amilasas; fitasas; xilanasas; galactanasas; alfa-galactosidasas; proteasas, fosfolipasas, beta-glucanasas, o cualquier mezcla de las mismas.
- 50 10. Uso del polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 como un inhibidor de formación de biopelícula.
11. Uso del polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 en una composición dental, en una composición detergente o en el pienso para animales.
- 55 12. Uso de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 para la descomposición de las paredes celulares de las bacterias.
13. Polinucleótido aislado que codifica el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.
- 60 14. Constructo de ácidos nucleicos o vector de expresión que comprende el polinucleótido según la reivindicación 13 operativamente enlazado a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un huésped de expresión.
- 65 15. Célula huésped recombinante que comprende el polinucleótido según la reivindicación 13 operativamente enlazado a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido.

16. Método para producir un polipéptido con actividad de lisozima, que comprende:

- (a) cultivo de la célula huésped según la reivindicación 15 bajo las condiciones conductoras para la producción del polipéptido; y
- (b) recuperación del polipéptido.

5

RDA con 10 μ l Lisozimas 0.7ug/ul y 0.35ug/ul manchados contra S.carnosus y E.coli 05.10.11

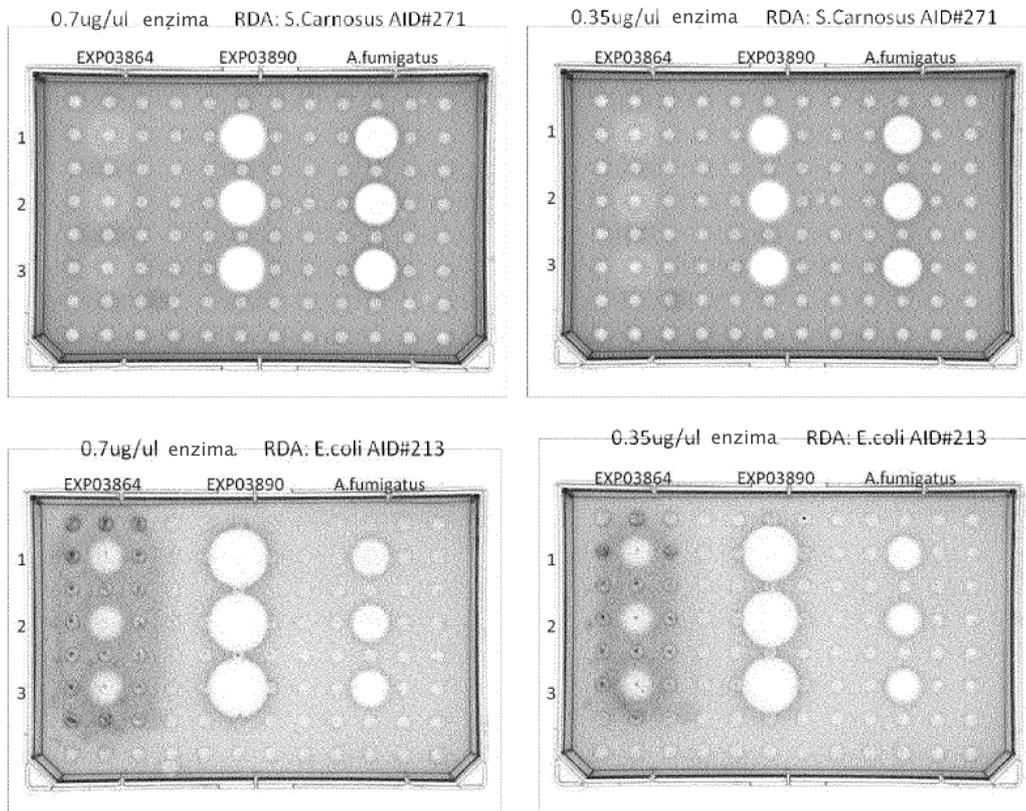


Fig. 1