



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 353 816**

51 Int. Cl.:
C08F 2/22 (2006.01)
C08F 2/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06764115 .9**
96 Fecha de presentación : **10.07.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1904534**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.04.2008**

54 Título: **Emulsión acuosa de monómeros que contiene hidrofobina.**

30 Prioridad: **14.07.2005 DE 10 2005 033 002**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.03.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.03.2011

73 Titular/es: **BASF SE**
67056 Ludwigshafen, DE

72 Inventor/es: **Kuhnle, Angelika;**
Karos, Marvin;
Subkowski, Thomas;
Boltschweiler, Claus;
Lemaire, Hans-Georg;
Exner, Christian y
Baus, Ulf

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 353 816 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

Emulsión acuosa de monómeros que contiene hidrofobina.

5 La presente invención comprende emulsiones de monómeros hidrófobos en agua que contienen partículas inorgánicas como emulsionantes de Pickering, e hidrofobina, así como un procedimiento para la obtención de dichas emulsiones, en donde los monómeros se dispersan en agua en presencia de partículas inorgánicas que actúan como emulsionante de Pickering, **caracterizado porque** también se utiliza hidrofobina.

10 La presente invención comprende, además, la utilización de hidrofobina en la fabricación de emulsiones de monómeros hidrófobos en agua, y un procedimiento para la polimerización en suspensión de monómeros hidrófobos en agua utilizando asimismo partículas inorgánicas como emulsionantes de Pickering, caracterizado porque también se utiliza hidrofobina.

La presente invención también comprende la utilización de las emulsiones como sustancia de aplicación en una polimerización en suspensión.

15 La presente invención comprende, por último, un procedimiento para la obtención de partículas poliméricas termoplásticas expansibles o expandidas utilizando asimismo un agente de expansión, caracterizado porque las partículas poliméricas son obtenidas con el procedimiento mencionado de polimerización en suspensión y las partículas poliméricas expansibles o expandidas obtenidas a través de este procedimiento, así como la utilización de dichas partículas poliméricas expansibles o expandidas para la obtención de espumas o cuerpos moldeados de espuma.

20 Las emulsiones de monómeros hidrófobos en agua se utilizan, entre otros, como materias primas en la polimerización. por ejemplo, una emulsión de estireno en agua se puede polimerizar mediante la polimerización en suspensión hasta obtener partículas de poliestireno. Si en ese caso se utilizan agentes de expansión, se obtienen partículas poliméricas que contienen agentes de expansión, , según las condiciones de presión y temperatura, expansibles o expandidas, a partir de las cuales se pueden obtener espumas o cuerpos de espuma.

30 Las emulsiones mencionadas de monómeros en agua en muchos casos se estabilizan mediante emulsionantes, como ocurre también con otras emulsiones de aceite en agua, dichos emulsionantes evitan que confluyan las gotitas de monómeros distribuidas en la fase acuosa. Como emulsionantes se utilizan usualmente compuestos orgánicos, especialmente, tensioactivos (por ejemplo, jabones, alquilsulfatos, compuestos de alcohol graso). Sin embargo, tienden a la formación de espuma, y dicha espuma puede dificultar notablemente la manipulación de la emulsión y, por ejemplo, hacer imposible un transporte mediante bombas de bombeo.

35 Dichos emulsionantes denominados de Pickering son conocidos, especialmente, por la polimerización en suspensión de emulsiones acuosas de monómeros, pero también de otras áreas de aplicación. Se entiende por dichos emulsionantes los compuestos inorgánicos insolubles en agua, por ejemplo, pirofosfato de magnesio o fosfato de calcio. Se utilizan en la emulsión en forma finamente distribuida e impiden el aglutinamiento de las gotitas de monómero que están siendo polimerizadas durante dicha polimerización. Presentan una tendencia mucho menor a la formación de espuma y pueden ser separadas tras la finalización de la polimerización a través de lavado. Sin embargo, el efecto de los emulsionantes de Pickering no siempre es satisfactorio, es decir, no siempre se obtiene una emulsión estable. Por ejemplo, la humectabilidad de las partículas de emulsionante de Pickering no siempre es tal que presente actividad surfactante.

45 La memoria DE 42 20 225 A1 presenta la obtención de productos de polimerización de estireno expansibles en forma de perlas a través de la polimerización de estireno en suspensión acuosa agregando agentes de expansión, en donde se utiliza, como estabilizador de suspensión, una mezcla de pirofosfato de magnesio, alquilsulfonatos como extendedor, y un carboxilato alcalino(térreo).

50 Las hidrofobinas son proteínas pequeñas de, aproximadamente, 100 a 150 aminoácidos, características de hongos filamentosos, por ejemplo, Schizophyllum commune. En principio, presentan 8 unidades de cisteína. Las hidrofobinas pueden aislarse de fuentes naturales. Pero también pueden obtenerse hidrofobinas no naturales, mediante procedimientos de elaboración químicos y/o biotecnológicos.

55 Las hidrofobinas presentan una afinidad marcada por superficies límite y por ello son adecuadas para el revestimiento de superficies. Por ejemplo, el Teflon® se puede revestir mediante hidrofobinas, conservando una superficie hidrófila.

Las hidrofobinas pueden aislarse de fuentes naturales. La patente alemana antigua, no publicada previamente, DE 102005007480.4 del 17/02/05 publica un procedimiento de elaboración de hidrofobinas.

5 En el estado actual de la técnica, se ha propuesto la utilización de hidrofobinas para diferentes utilidades.

La memoria WO 01/57528 publica el revestimiento de ventanas, lentes de contacto, biosensores, equipos médicos, recipientes para la realización de pruebas o para el almacenamiento, cascos del barco, partículas sólidas o marcos o carrocería de coches con una hidrofobina que contiene una solución a una temperatura de 30 a 80° C.

10 La memoria WO 01/57066 describe un procedimiento especial para el revestimiento con hidrofobina.

La memoria WO 03/53383 publica la utilización de hidrofobina para el tratamiento de materiales de queratina en utilidades cosméticas.

15 La memoria WO 03/10331 publica un sensor revestido con hidrofobina, por ejemplo, un electrónica de medición, al cual están unidos a otras sustancias no covalentes, por ejemplo, sustancias electroactivas, anticuerpos o enzimas.

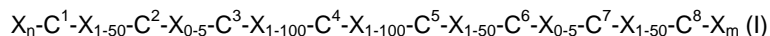
20 La memoria WO 96/41882 propone, en las páginas 9-10, la utilización de hidrofobinas como emulsionantes, espesantes, sustancias surfactantes, para la hidrofiliación de superficies hidrófobas, para mejorar la resistencia al agua de sustratos hidrófilos, para obtener emulsiones de aceite en agua o de emulsiones de agua en aceite. Además, se propone la utilización en alimentos para la mejora de su capacidad de almacenamiento, usos farmacéuticos, como la obtención de pomadas o cremas, así como la utilización cosmética, como protección de la piel o la obtención de champús o enjuagues para el cabello.

25 El objeto es presentar emulsiones de monómero en agua con una composición alternativa. La emulsión no debería tender a la formación de espuma y ser estable durante varias horas, es decir, no mostrar una separación. En una situación ideal, debería polimerizarse a través de polimerización en suspensión.

30 Acorde a ello, se hallaron las emulsiones, los procedimientos, las utilidades y las partículas poliméricas mencionados al comienzo. Los modos de ejecución preferidos de la presente invención se desprenden de las subreivindicaciones. Todas las indicaciones de presión son presiones absolutas.

Hidrofobina

35 Las emulsiones acordes a la invención contienen hidrofobina. Se entiende por "hidrofobina", acorde a la presente invención, preferentemente, las proteínas de la fórmula estructural general (I)



40 en donde X puede representar cada uno de los 20 aminoácidos naturales que existen (Phe, Leu, Ser, Tyr, Cys, Trp, Pro, His, Gln, Arg, Ile, Met, Thr, Asn, Lys, Val, Ala, Asp, Glu, Gly). A su vez, X pueden ser respectivamente iguales o diferentes. Asimismo, los índices junto a X representan la cantidad de aminoácidos. C es cisteína, alanina, serina, glicina, metionina o treonina, en donde, al menos, cuatro de los radicales identificados con C representan cisteína, los índices n y m son, independientemente entre sí, números naturales de 0 a 500, preferentemente, de 15 a 300.

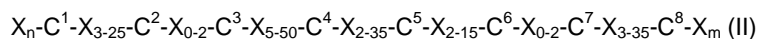
45 Los polipéptidos acordes a la fórmula (I) se caracterizan, además, porque a temperatura ambiente y tras revestir una superficie de vidrio provocan un incremento del ángulo de contacto de una gota de agua de, al menos, 20°, preferentemente, al menos, 25° y de modo especialmente preferido, 30°, respectivamente, en comparación con el ángulo de contacto de una gota de agua del mismo tamaño con la superficie de vidrio sin revestir.

50 Los aminoácidos identificados con C¹ a C⁸ son, preferentemente, cisteínas; pero también pueden ser reemplazados por otros aminoácidos de similar densidad relativa, preferentemente, por alanina, serina, treonina, metionina o glicina. Sin embargo, al menos cuatro, preferentemente, al menos 5, de modo especialmente preferido, al menos 6 y especialmente, al menos 7 de las posiciones C¹ a C⁸ debe consistir en cisteínas. En las proteínas acordes a la invención, las cisteínas pueden

hallarse o bien reducidas o formado entre ellas puentes de disulfuro. Es especialmente preferida la configuración intermolecular de puentes C-C, especialmente, aquellos con, al menos, uno, preferentemente, 2, de modo especialmente preferido, 3 y sobre todo, 4 puentes de disulfuro intramoleculares. En el intercambio descrito de cisteínas por aminoácidos de similar densidad relativa se intercambian a pares, de manera ventajosa, aquellas posiciones C que pueden conformar entre sí puentes de disulfuro intramoleculares.

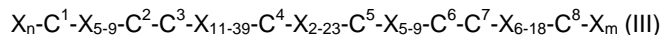
En el caso de que en las posiciones identificadas con X también se utilice cisteína, serina, alanina, glicina, metionina o treonina, la numeración de las posiciones individuales C puede modificarse correspondientemente en las fórmulas generales.

10 Preferentemente, para la ejecución de la presente invención se utilizan hidrofobinas de la fórmula general (II)



15 en donde X, C y los índices junto a X y C presentan el significado anteriormente mencionado, sin embargo, los índices n y m representan, independientemente entre sí, números naturales de 0 a 300. De modo preferido, las proteínas se caracterizan, además, por la modificación del ángulo de contacto mencionada.

De modo especialmente preferido, se utilizan hidrofobinas de la fórmula general (III)



20 en donde X, C y los índices que se encuentra junto a X, presentan los significados mencionados, y los índices n y m son números naturales de 0 a 200. Preferentemente, las proteínas se caracterizan además por la modificación del ángulo de contacto mencionada. También se prefiere que en, al menos, seis de los radicales identificados con C se trate de cisteína. De modo especialmente preferido, todos los radicales C son cisteína.

25 En el caso de los radicales X_n y X_m se puede tratar de secuencias de péptidos, enlazados naturalmente con una hidrofobina. Pero en el caso de uno o ambos radicales también puede tratarse de secuencias de péptidos que no estén enlazados naturalmente con una hidrofobina. Entre ellos también se contemplan aquellos radicales X_n y/o X_m en los cuales una secuencia de péptidos que naturalmente se presenta en una hidrofobina esté prolongada con una secuencia de péptidos que no se presenta naturalmente en una hidrofobina.

30 En el caso de que X_n y/o X_m no sean secuencias de péptidos naturalmente enlazadas con hidrofobinas, dichas secuencias en general tienen una longitud de, al menos 20, preferentemente, al menos 35, de modo especialmente preferido, al menos 50 y sobre todo, al menos 100 aminoácidos. Un radical de este tipo, no enlazado naturalmente con una hidrofobina, en adelante también será denominado elemento de fusión. Con ello se desea expresar que las proteínas pueden consistir en, al menos, una parte de hidrofobina y un elemento de fusión que no se encuentran unidos de esta manera en la naturaleza.

35 El elemento de fusión puede ser seleccionado entre una cantidad de proteínas. También pueden ser enlazados múltiples elementos de fusión con una parte de hidrofobina, por ejemplo, en el aminotérmino (X_n) y en el carboxitérmino (X_m) de la parte de hidrofobina. Pero también pueden ser enlazados, por ejemplo, dos elementos de fusión con una posición (X_n o X_m) de la proteína acorde a la invención.

45 Son partes de elementos de fusión especialmente adecuados las proteínas presentes de forma natural en microorganismos, especialmente, en *E. coli* o *Bacillus subtilis*. Ejemplos de tales partes de elementos de fusión son las secuencias yaad (SEQ ID NO: 15 y 16), yaae (SEQ ID NO: 17 y 18), y tioredoxina. También son adecuados los fragmentos o derivados de dichas secuencias mencionadas, que sólo comprenden una parte, preferentemente, 70-99 %, de modo especialmente preferido 80-98 % de las secuencias mencionadas, o en las cuales los aminoácidos o nucleótidos individuales están modificados respecto de la secuencia mencionada, asimismo, los porcentajes se refieren siempre a la cantidad de aminoácidos.

50 Las proteínas utilizadas acorde a la invención también pueden estar modificadas en su secuencia de polipéptidos, por ejemplo, por glicosilación, acetilización o también por reticulación transversal química, por ejemplo, con glutardialdehído.

Una característica de las proteínas utilizadas acorde a la invención es la modificación de las características de superficie cuando las superficies son revestidas con las proteínas. La

modificación de las características de superficie se puede determinar de modo experimental a través de la medición del ángulo de contacto de una gota de agua antes y después del revestimiento de la superficie con la proteína y la determinación de la diferencia entre ambas mediciones.

5 La realización de las mediciones de ángulo de contacto son conocidas por el experto. Las mediciones se refieren a la temperatura ambiente así como a gotas de agua de 5µl. Las condiciones precisas de experimentación para un método adecuado, a modo de ejemplo, para la medición del ángulo de contacto están representadas en la parte experimental. En las condiciones mencionadas, las proteínas utilizadas acorde a la invención poseen la características de incrementar el ángulo de contacto en, al menos, 20°, preferentemente, al menos, 25°, de modo especialmente preferido, al menos, 30°, siempre en comparación con el ángulo de contacto de una gota de agua del mismo tamaño con la superficie de vidrio no revestida.

15 En la parte de hidrofobina de las hidrofobinas conocidas hasta ahora, las posiciones de los aminoácidos polares y homopolares se conserva, lo cual se expresa en un plot de hidrofobicidad. Las diferencias de las características biofísicas y de la hidrofobicidad producen la división de las hidrofobinas conocidas en dos clases, I y II (Wessels et al. 1994, Ann. Rev. Phytopathol., 32, 413-437).

20 Las membranas ensambladas de la clase I de hidrofobinas son altamente insolubles (inclusive respecto a 1 % de dodecilsulfato de Na (SDS) a temperatura elevada) y sólo pueden ser disociadas nuevamente con ácido trifluoroacético concentrado (TFA), o ácido fórmico. A diferencia de ello, las formas ensambladas de las hidrofobinas de la clase II son poco estables. Pueden ser disueltos nuevamente ya con etanol al 60 %, o 1 % de SDS (a temperatura ambiente).

25 Una comparación de las secuencias de aminoácidos indica que la longitud del área entre cisteína C3 y C4 en las hidrofobinas de la clase II es notablemente más corta que en el caso de las hidrofobinas de la clase I. Las hidrofobinas de la clase II presentan, además, más aminoácidos cargados que los de la clase I.

30 Las hidrofobinas especialmente preferidas para la ejecución de la presente invención son las hidrofobinas del tipo dewA, rodA, hypA, hypB, sc3, basf1 y basf2, que están caracterizadas en el siguiente protocolo de secuencia. también se puede tratar de sus partes o derivados. También pueden enlazarse múltiples partes de hidrofobina, preferentemente, 2 o 3, de estructura igual o diferente con una correspondiente secuencia de polipéptidos adecuada, no enlazada naturalmente con una hidrofobina.

35 Son especialmente adecuadas para la realización de la presente invención, además, las proteínas de fusión con las secuencias de polipéptidos representadas en SEQ ID NO: 20, 22, 24 así como las secuencias de ácido nucleico codificadas para ello, especialmente, las secuencias acorde a SEQ ID NO: 19, 21, 23. También son modos de ejecución especialmente preferidos las proteínas obtenidas partiendo de secuencias de polipéptidos representadas en SEQ ID NO: 22, 22 o 24 a través de intercambio, inserción o delección de, al menos, uno a 10, preferentemente 5, de modo especialmente preferido, 5 % de todos los aminoácidos, y que aún presentan la característica biológica de las proteínas de partida en, al menos, un 50 %. Por característica biológica de la proteína se entiende en este caso el incremento del ángulo de contacto ya descrito en, al menos, 20°.

45 La hidrofobina se utiliza, preferentemente, en una cantidad de 20 a 150, especialmente, de 30 a 100 y, de modo especialmente preferido, de 40 a 90 ppmw (parts per million by weight o partes por millón por peso), en relación a la cantidad total de la emulsión. Para el estireno como monómero, la cantidad de hidrofobina es de, por ejemplo, 20 a 100, especialmente, 40 a 90 ppmw, en relación a la emulsión.

La hidrofobina de la emulsión se puede agregar como tal, o disuelta o dispersada en un agente de solución o de dispersión. Un agente de solución o de dispersión adecuado es el agua. La cantidad de hidrofobina de dicha solución o dispersión en general es de 0,3 a 1,2, preferentemente, de 0,35 a 0,5 % en peso. Preferentemente, se agrega la hidrofobina como solución acuosa.

50 Fabricación de la hidrofobina

La hidrofobina utilizada acorde a la invención se puede obtener químicamente mediante procedimientos conocidos de síntesis de péptidos, por ejemplo, a través de la síntesis de fase sólida según Merrifield.

Las hidrofobinas naturales se pueden aislar de fuentes naturales con métodos adecuados. Mencionaremos a modo de ejemplo a Wösten et. al., Eur. J Cell Bio 63, 122-129 (1994) o a WO 96/41882.

5 La obtención de proteínas de fusión se puede llevar a cabo a través de procedimientos de técnica genética, en los cuales se combinan una secuencias de ácido nucleico codificada para el elementos de fusión y una para la parte de hidrofobina, especialmente, una secuencia de ADN, de modo tal que en un organismo huésped se genera la proteína deseada a través de la expresión genética de la secuencia de ácido nucleico combinada. Un procedimiento de elaboración de ese tipo se publica en la memoria antigua mencionada anterioremente Az. DE 102005007480.4.

10 Los organismos huésped adecuados (organismos de producción) para el procedimiento de elaboración mencionado pueden ser, a su vez, procariontes (inclusive las archaea) o eucariontes, especialmente, bacterias, inclusive, halobacterias y methanococcus, hongos, células de insectos, células vegetales y de mamíferos, de modo especialmente preferido, Escherichia coli, Bacillus subtilis, Bacillus megaterium, Aspergillus oryzea, Aspergillus nidulans, Aspergillus niger, Pichia pastoris, 15 Pseudomonas spec., Lactobacillen, Hansenula polymorpha, Trichoderma reesei, SF9 (o células emparentadas), entre otros.

También es posible la utilización de constructos de expresión que contienen, en el control genético de secuencias reguladoras de ácido nucleico, una secuencia de ácido nucleico que codifica para una enzima acorde a la invención; así como vectores que comprenden, al menos, uno de dichos 20 constructos de expresión.

Preferentemente, los constructos utilizados comprenden 5' aguas arriba de la secuencia respectivamente codificante, un promotor, y 3' aguas abajo, una secuencia de terminador así como, eventualmente, otros elementos reguladores usuales, a saber, enlazados respectivamente con la secuencia codificante.

25 Por un "enlace operativo" se entiende, en la disposición secuencial de promotor, la secuencia codificante, terminador y, eventualmente, otros elementos reguladores, de modo que cada uno de los elementos reguladores pueda cumplir con su función en la expresión de la secuencia codificante, acorde a lo determinado.

30 Ejemplos de secuencias que pueden ser enlazadas operativamente son las secuencias diana así como potenciadores, señales de poliadenilización y similares. Otros elementos de regulación comprenden marcadores selectivos, señales de amplificación, orígenes de replicación y similares. Las secuencias adecuadas de regulación están descritas, por ejemplo, en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185 (Métodos de enzimología), Academic Press, San Diego, CA (1990).

35 Adicionalmente a estas secuencias reguladoras, puede estar presente todavía la regulación natural de dichas secuencias antes de los genes estructurales en sí y, eventualmente, haber sido modificadas genéticamente, de modo que la regulación natural se desactive y se incremente la expresión de los genes.

40 Un constructo preferido de ácido nucleico también contiene, de manera ventajosa, una o múltiples de las secuencias "potenciadoras" mencionadas, enlazadas funcionalmente con el promotor, que posibilita una expresión incrementada de la secuencia de ácido nucleico. También en el extremo 3' de las secuencias de ADN pueden insertarse secuencias adicionales ventajosas, como otros elementos reguladores o terminadores.

45 Los ácidos nucleicos pueden encontrarse en una o múltiples copias en el constructo. En el constructo pueden hallarse otros marcadores, como genes complementarios a resistencias a antibióticos o auxotrofias, eventualmente, para la selección en el constructo.

50 Secuencias ventajosas de regulación para el procedimiento acorde a la invención están presentes, por ejemplo, en promotores como cos, tac, trp, tet, trp, tet, lpp, lac, lpp, lac, lacIq-T7, T5, T3, gal, trc, ara, rhaP(rhaPBAD) SP6, lambda-PR o en el promotor lambda-P, que se utilizan, de manera ventajosa, en bacterias gram negativas. Otras secuencias ventajosas de regulación se encuentran, por ejemplo, en los promotores gram positivos amy y SPO2, en promotores de levadura u hongos ADC1, MFalpha, AC, P-60, CYC1, GAPDH, TEF, rp28, ADH.

También pueden utilizarse promotores artificiales para la regulación.

55 El constructo de ácido nucleico es insertado para la expresión en un organismo huésped, de manera ventajosa, en un vector, como por ejemplo, un plásmido o un fago, que posibilita una

expresión óptima de los genes en el huésped. Por vectores se entienden, además de plásmidos y fagos, también todos los demás vectores conocidos por el experto, por ejemplo, virus, como SV40, CMV, baculovirus y adenovirus, transposones, elementos IS, fasmidos, cósmidos, y ADN lineales o circulares, así como el sistema agrobacterium.

5 Dichos vectores pueden ser replicados autónomamente o cromosómicamente en el organismo huésped. Dichos vectores representan otra realización de la invención. Los plásmidos adecuados se encuentran, por ejemplo, en *E. coli* pLG338, pACYC184, pBR322, pUC18, pUC19, pKC30, pRep4, pHS1, pKK223-3, pDHE19.2, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III³-B1, tgt11 o pBdCl, en *Streptomyces* pJ101, pJ364, pJ702 o pJ361, en *Bacillus* pUB110, pC194 o
10 pBD214, en *Corynebacterium* pSA77 o pAJ667, en hongos pALS1, pIL2 o pBB116, en levaduras 2alpha, pAG-1, YEp6, YEp13 o pEMBLYe23 o en plantas pLGV23, pGHlac+, pBIN19, pAK2004 o pDH51. Los plásmidos mencionados representan una pequeña selección de los posibles plásmidos. Otros plásmidos también son conocidos por el experto y pueden ser tomados, por ejemplo, del libro Cloning Vectors (Vectores de clonación), (Eds. Pouwels P. H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-
15 Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018).

De manera ventajosa, el constructo de ácido nucleico contiene, adicionalmente, para la expresión de los demás genes presentes, secuencias reguladoras terminales 3' y/o 5' para el incremento de la expresión, seleccionados acorde al organismo huésped y al gen o los genes elegidos para una expresión óptima.

20 Dichas secuencias reguladoras deben posibilitar la expresión adecuada de los genes y de la expresión proteica. Esto puede significar, según el organismo huésped, que el gen se expresa o sobreexpresa sólo tras la inducción, o que es expresado o sobreexpresado inmediatamente.

Las secuencias reguladoras o factores reguladores pueden, a su vez, influir, preferentemente, en la expresión genética de los genes incorporados, e incrementarla. Por ejemplo,
25 un aumento de los elementos reguladores puede realizarse de manera ventajosa en el plano de la transcripción, utilizando señales intensas de transcripción como promotores y/o "potenciadores". Pero también es posible un refuerzo de la traslación, por ejemplo, mejorando la estabilidad de los ARNm.

En otro modo de ejecución del vector, el constructo de ácido nucleico acorde a la invención, o el vector que contiene ácido nucleico también puede ser introducido, de manera
30 ventajosa, en forma de un ADN lineal en los microorganismos y ser integrado en el genoma del organismo huésped mediante recombinación heteróloga u homóloga. Dicho ADN lineal puede consistir en un vector linealizado, como un plásmido o sólo en un constructo de ácido nucleico o el ácido nucleico.

35 Para una expresión óptima de genes heterólogos en los organismos es ventajoso modificar las secuencias de ácido nucleico del "codon usage" (uso de codones) utilizado correspondientemente al organismo. El "codon usage" se puede determinar de manera sencilla a partir de evaluaciones mediante el ordenador de otros genes conocidos del correspondiente organismo.

La obtención de un cassette de expresión se lleva a cabo por fusión de un promotor adecuado con una secuencia de nucleótidos codificante adecuada así como una señal de terminador
40 o poliadenilización. Para ello, se utilizan técnicas habituales de recombinación y clonación, por ejemplo, las descritas en T. Maniatis, E.F. Fritsch y J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Clonación molecular: un manual de laboratorio), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) y en T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions (Experimentos con fusión genética), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) y
45 en Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology (Protocolos actuales de la biología molecular), Greene Publishing Assoc. y Wiley Interscience (1987).

El constructo de ácido nucleico recombinante, o el constructo genético, son insertados para la expresión en un organismo huésped adecuado, de manera ventajosa, en un vector de huésped específico, que posibilita una expresión óptima de los genes en el huésped. Los vectores son
50 conocidos por el experto y pueden ser tomados, por ejemplo, de "Cloning Vectors" (Vectores de clonación), (Pouwels P. H. et al., Hrsg, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985).

Mediante los vectores se pueden obtener microorganismos recombinantes transformados, por ejemplo, con, al menos, un vector y que pueden ser implementadas para la producción de las proteínas utilizadas acorde a la invención. De manera ventajosa, los constructos recombinantes
55 descritos son dispuestos en un sistema huésped adecuado y allí son expresados. Para ello se utilizan, preferentemente, los métodos habituales de clonación y transfección conocidos por el experto, por ejemplo, co-precipitación, fusión de protoplastos, electroporación, transfección retroviral y similares,

para que se expresen los ácidos nucleicos mencionados en el sistema de expresión respectivo. Los sistemas adecuados están descritos, por ejemplo, en *Current Protocols in Molecular Biology* (Protocolos actuales de la biología molecular), F. Ausubel et al., Hrsg., Wiley Interscience, New York 1997, o Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Anticuerpos: un manual de laboratorio). 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

También se pueden obtener microorganismos de recombinación homóloga. Para ello, se fabrica un vector que contiene, al menos, un segmento de un gen por utilizar acorde a la invención o de una secuencia codificante, en donde, eventualmente, se ha colocado una delección, adición o sustitución de aminoácidos para modificar la secuencia, por ejemplo, disrumpirla funcionalmente (vector de bloqueo o knockout). La secuencia introducida también puede, por ejemplo, ser un homólogo de un microorganismo emparentado o ser derivada de una fuente de mamífero, levadura o insectos. El vector utilizado para la recombinación homóloga puede estar configurado, de modo alternativo, de modo tal que en la recombinación homóloga el gen endógeno mute o se modifique de otra manera, pero la proteína funcional aún codifique (por ejemplo, el área reguladora dispuesta aguas arriba estar modificada de modo tal que por ello se modifique la expresión de la proteína endógena). El segmento modificado del gen utilizado acorde a la invención se encuentra en el vector de recombinación homólogo. La construcción de los vectores adecuados para la recombinación homóloga está descrita, por ejemplo, en Thomas, K.R. y Capecchi, M.R. (1987) *Cell* 51:503. .

Como organismos huéspedes recombinantes para el ácido nucleico o el constructo de ácido nucleico utilizados acorde a la invención, se pueden utilizar, en principio, todos los organismos procarionticos o eucarióticos. De manera ventajosa, se utilizan organismos huésped como bacterias, hongos o levaduras. de manera ventajosa, se utilizan bacterias gram-positivas o gram-negativas, preferentemente, bacterias de las familias de Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Rhizobiaceae, Streptomycetaceae o Nocardiaceae, de modo especialmente preferido, bacterias del género de *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Nocardia*, *Burkholderia*, *Salmonella*, *Agrobacterium* o *Rhodococcus*.

Los organismos utilizados en el procedimiento de fabricación de proteínas de fusión se cultivan, según el organismo huésped, de manera conocida por el experto. Los microorganismos generalmente se cultivan en un medio líquido que contiene una fuente de carbono, en general, en forma de azúcares, una fuente de nitrógeno, en general, en forma de fuentes orgánicas de nitrógeno, como extracto de levadura, o sales, como sulfato de amonio, oligoelementos como sales de hierro, manganeso, magnesio y, eventualmente, vitaminas, a temperaturas de 0° C a 100 C, preferentemente, de 10° C a 60° C, bajo suministro de oxígeno gaseoso. A su vez, el valor de pH de los nutrientes líquidos puede mantenerse en un valor fijo, es decir, ser regulado o no durante el cultivo. El cultivo puede realizarse de modo discontinuo, semicontinuo o continuo. Los nutrientes pueden ser dispuestos al comienzo de la fermentación o ser suministrados posteriormente de manera semicontinua o continua. Las enzimas pueden ser aisladas de los organismos, acorde a los procedimientos descritos, o ser utilizadas como extracto crudo para la reacción.

Las proteínas utilizadas acorde a la invención o sus fragmentos funcionales, biológicamente activos, pueden ser obtenidos mediante un procedimiento recombinante, en el cual se cultiva un microorganismo que produce las proteínas, eventualmente, se induce la expresión de las proteínas y se las aísla del cultivo. De ese modo, los polipéptidos también pueden ser producidos a escala industrial si es necesario. El microorganismo recombinante puede ser cultivado y fermentado según los procedimientos conocidos. Las bacterias pueden reproducirse, por ejemplo, en medios TB o LB y a una temperatura de 20 a 40° C y un valor de pH de 6 a 9. Se describen condiciones de cultivo individuales, por ejemplo, en T. Maniatis, E. F. Fritsch y J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Clonación molecular: un manual de laboratorio), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989).

Las células se desintegran en el caso de que no se segreguen las proteínas utilizadas acorde a la invención y el producto es obtenido a partir del lisado según procedimientos conocidos de aislamiento proteico. Las células pueden ser desintegradas por ultrasonido de alta frecuencia, por presión elevada, por ejemplo, en una prensa French, por lisis osmótica, por efecto de detergentes, enzimas líticas o disolventes orgánicos, por homogeneizadores o por combinación de varios de los procedimientos enumerados.

Una purificación de las proteínas utilizadas acorde a la invención puede lograrse con procedimientos cromatográficos conocidos, como la cromatografía de tamiz molecular (de filtración en gel), como cromatografía Q-sefarosa, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía hidrófoba, así como con otros procedimientos usuales como ultrafiltración, cristalización, salificación, diálisis y electroforesis nativa en gel. En Cooper, F. G., *Biochemische Arbeitsmethoden* (Métodos de trabajo

bioquímicos), Editorial Walter de Gruyter, Berlín, New York o en Scopes, R., Protein Purification (Purificación de proteínas), Editorial Springer, New York, Heidelberg, Berlín, por ejemplo, se describen procedimientos adecuados.

5 Puede ser ventajoso para el aislamiento de la proteína recombinante utilizar sistemas de vectores u oligonucleótidos que prolonga el ADNc en unas determinadas secuencias de nucleótidos y con ello, codifica para proteínas modificadas o proteínas de fusión que sirven, por ejemplo, para una purificación más simple. Dichas modificaciones adecuadas comprenden, por ejemplo, los denominados "tags" que funcionan como anclajes, por ejemplo, la modificación conocida como anclaje de hexa-histidina o epítipo, que pueden ser reconocidos como antígenos de anticuerpos (descritos, por ejemplo, en Harlow, E. y Lane, D., 1988, Antibodies: A Laboratory Manual (Anticuerpos: un manual de laboratorio). Cold Spring Harbor (N. Y.) Press). Otros tags adecuados son, por ejemplo, HA, Calmodulin-BD, GST, MBD; Chitin-BD, Steptavidin-BD-Avi-Tag, Flag-Tag, T7. Dichos anclajes pueden servir para la adhesión de las proteínas a un portador sólido, por ejemplo, una matriz de polímero, que puede estar rellena en una columna de cromatografía, o puede ser utilizada en una placa de microtitulación o en otro tipo de portador. Se pueden utilizar los demás portadores correspondientes. Los protocolos de limpieza correspondientes se pueden obtener en los proveedores comerciales de tags afines.

20 Las proteínas descritas pueden ser utilizadas tanto directamente, como proteínas de fusión, como así también tras la disociación y separación de los elementos de fusión, como hidrofobina "pura".

Si se prevé una separación de los elementos de fusión, es recomendable incorporar un potencial punto de corte (punto de reconocimiento específico para proteasas) en la proteína de fusión entre la parte de hidrofobina y la parte del elemento de fusión. En el punto de corte son especialmente adecuadas aquellas secuencias de péptidos que de otra manera no se presentan, ni en la parte de hidrofobina ni en la parte del elemento de fusión, lo cual se puede determinar de manera sencilla con herramientas bioinformáticas. Son especialmente adecuadas, por ejemplo, la disociación de BrCN en metionina, o la disociación generada por proteasa con disociación de factor Xa, enteroquinasa, trombina, TEV (tobacca etch virus).

Monómeros

30 Como monómeros para la emulsión acorde a la invención son especialmente adecuados los monómeros hidrófobos. En cuyo caso hidrófobo significa que al unir los monómeros con agua se forman dos fases, es decir, los monómeros no se pueden mezclar con agua o son poco miscibles con ella.

35 Se prefiere el monómero estireno, en donde, eventualmente, también se pueden utilizar comonómeros en cantidades de hasta 50 % en peso, en relación a la cantidad total de monómeros. Dichos comonómeros son, por ejemplo, α -metilestireno, estirenos de núcleo halogenado, estirenos de núcleo alquilado, acrilnitrilo, éster de ácido acrílico o ácido metacrílico de alcoholes con 1 a 8 átomos de C, compuestos N-vinilo, como vinilcarbazol o también cantidades reducidas de compuestos con dos dobles enlaces polimerizables, por ejemplo, butadieno, divinilbenceno o diacrilato de butanodiol. De modo especialmente preferido, se utiliza sólo estireno.

40 Acorde a ello, se prefieren las emulsiones acordes a la invención **caracterizadas porque** el monómero es estireno, en donde se pueden utilizar comonómeros seleccionados entre α -metilestireno, estirenos de núcleo halogenado, estirenos de núcleo alquilado, acrilnitrilo, ésteres de ácido acrílico o ácido metacrílico de alcoholes C₁₋₈, compuestos N-vinilo, butadieno, divinilbenceno o diacrilato de butanodiol.

45 La relación en volumen de monómero y agua en la emulsión acorde a la invención (relación en volumen de fases) depende, entre otros, de los monómeros utilizados y en general es de 0,75 : 1 a 1,5 : 1, especialmente 0,9 : 1 a 1,4 : 1, y de modo especialmente preferido, de 1 : 1 a 1,4 : 1. Para el estireno como monómero, la relación en volumen de estireno y agua es, por ejemplo, de 1 : 1 a 1,5 : 1, preferentemente, de 1,1 : 1 a 1,4 : 1 y especialmente 1,2 : 1 a 1,3:1.

Partícula inorgánica

Acorde a la invención, la emulsión contiene partículas inorgánicas como emulsionantes de Pickering. Dichas partículas se conocen, por ejemplo, de Aveyard et al., Adv. Coll. Interf. Sci. 100-102 (2003), 503-546.

Se prefieren las partículas inorgánicas seleccionadas entre partículas que contienen pirofosfato de magnesio (MPP), sulfato de bario, óxido de zinc y fosfato de calcio. Entre ellas se prefieren las partículas que contienen pirofosfato de magnesio, especialmente, estireno como monómero.

5 La obtención de dichas partículas (emulsionantes de Pickering) se lleva a cabo a través de las conversiones usuales en la química inorgánica, es decir, por ejemplo, a través de la precipitación de una solución o de reacciones de cuerpos sólidos. Preferentemente, las partículas se obtienen directamente antes de su utilización a través de la reunión de soluciones acuosas adecuadas o la
10 adición de una solución acuosa a una sustancia sólida, en donde las partículas reobtienen como compuesto poco soluble.

Por ejemplo, se puede obtener la partícula de MPP a través de la unión de la solución acuosa de un pirofosfato alcalino con, al menos, la cantidad estequiométricamente requerida de sal de magnesio, asimismo, la sal de magnesio se puede hallar en forma sólida o acuosa. En un modo de realización especialmente preferido, el MPP se obtiene a través de la unión de las soluciones acuosas
15 de pirofosfato de sodio ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) y sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Preferentemente, se dispone el pirofosfato de sodio disuelto y se agrega la solución de sulfato de magnesio. La sal de magnesio se agrega en, al menos, la cantidad estequiométricamente necesaria, preferentemente, en la cantidad estequiométricamente necesaria exacta. Sobre todo, no debería presentarse un excedente de pirofosfato alcalino.

20 De modo especialmente preferido, el MPP no se obtiene en presencia de la cantidad total de fase acuosa de la emulsión. Es ventajoso utilizar menos de la mitad del agua total utilizada para la obtención de la emulsión. Por ejemplo, a una solución de pirofosfato de sodio al 3 % en peso se le puede agregar una solución de sulfato de magnesio al 20 % en peso, aproximadamente. Otros detalles se pueden encontrar en la memoria DE 42 20 225 A1.

25 El tamaño de partículas de las partículas inorgánicas (emulsionantes de Pickering) se controlan con las condiciones de precipitación y es, usualmente, de 10 nm a 10 μm , preferentemente, 10 nm a 1 μm y, de modo especialmente preferido, 20 a 100 μm , expresado ~~cámetröi~~ de partículas de media numérica d50 (cada 50 % de las partículas son menores o mayores que el diámetro de d50). Preferentemente, dichas partículas presentan una forma no esférica.

30 Las partículas inorgánicas se utilizan, en general, en cantidades de 500 a 1000, preferentemente, 600 a 900, y de manera especialmente preferida, de 700 a 800 ppmw respecto de la emulsión. Para el estireno como monómero, generalmente, la cantidad es de, por ejemplo, 600 a 900, especialmente, 700 a 800 ppmw, en relación a la emulsión.

35 Las partículas inorgánicas de la emulsión se pueden agregar como tales o, preferentemente, suspendidas en un agente de suspensión. Un agente de suspensión adecuado es el agua. Preferentemente, se utiliza directamente la suspensión acuosa obtenida en la obtención de partículas. Dicha suspensión contiene, por ejemplo, 1 a 2, preferentemente, 1,7 a 1,9 % en peso de partículas inorgánicas. Se prefiere especialmente la utilización de una suspensión nueva.

Otros componentes de la emulsión

40 Además de agua, monómeros, partículas inorgánicas (emulsionantes de Pickering) e hidrofobina, la emulsión acorde a la invención puede contener otros componentes.

Se puede agregar, por ejemplo, un agente de expansión, en tanto la emulsión acorde a la invención se deba someter a una polimerización y, en ese caso, se deban obtener partículas
45 poliméricas que contengan un agente de expansión, expansibles o expandidas. Los agentes de expansión adecuados son, especialmente, agentes de expansión físicos como dióxido de carbono, hidrocarburos alifáticos con 2 a 7 átomos de carbono, alcoholes, cetonas, éteres, hidrocarburos halogenados o agua, o sus mezclas. Si, por ejemplo, se debe polimerizar una emulsión de estireno en agua para obtener partículas de poliestireno que contienen agentes de expansión, se utiliza, preferentemente, propano, iso-butano, n-butano, iso-pentano, neopentano, n-pentano, hexano, dióxido
50 de carbono o sus mezclas.

En el caso de que se agregue un agente de expansión, la cantidad usualmente es de 1 a 10, preferentemente, de 3 a 8 % en peso, en relación a la cantidad de monómeros.

55 Pero la adición de un agente de expansión no es un requisito obligatorio, ya que, como es conocido, las partículas poliméricas que contienen agentes de expansión también pueden obtenerse con otros procedimientos, por ejemplo, a través de impregnación de las partículas poliméricas

acabadas con el agente de expansión bajo presión elevada y temperatura elevada, en donde el agente de expansión se difunde en la partícula ablandada, o en el denominado procedimiento de extrusión a través de la incorporación del agente de expansión en una masa fundida de polímero en una extrusora y la granulación de la masa obtenida.

5 Además, ya a la emulsión se le pueden agregar otros aditivos usuales, por ejemplo, agentes de nucleación, ablandantes, agentes ignífugos, antiestáticos, antioxidantes, absorbentes de UV, absorbentes de IR como hollín y grafito, polvo de aluminio, colorantes solubles y no solubles y pigmentos. Los aditivos se utilizan las cantidades usuales. Los agentes de nucleación adecuados en el caso de estireno como monómero o poliestireno como partícula polimérica son, por ejemplo, talco y/o
10 ceras así como hollín, grafito y ácido silícico pirógeno, en cantidades de, en total, 0,05 a 30 % en peso, en relación a la cantidad de monómeros. Los ablandantes preferidos son aceites minerales, polímeros de estireno oligómeros y ftalatos en cantidades de, en total, 0,05 a 10 % en peso, en relación a la cantidad de monómeros.

15 Sin embargo, tampoco se pueden agregar dichos aditivos a la emulsión, sino sólo en un momento posterior, por ejemplo, a las partículas poliméricas obtenidas.

La emulsión puede contener, además, otros emulsionantes orgánicos (tensioactivos), por ejemplo, alquilsulfonatos. Entre ellos se encuentran las sales alcalinas de ácido dodecilbenzolsulfónico o sales alcalinas de una mezcla de ácido alquilosulfónico C₁₂₋₁₇, por ejemplo, una mezcla de, predominantemente, sulfonatos de sodio secundarios con una longitud de cadena media C₁₅, que
20 contiene hasta 0,2 % en peso de cloro de enlace orgánico (producto comercial Mersotat® K30 de Bayer). Sin embargo, se prefiere no utilizar dichos emulsionantes orgánicos diferentes, para evitar un espumado indeseado de la emulsión.

Por ello, las emulsiones acordes a la invención preferentemente no contienen emulsionantes orgánicos o tensioactivos.

25 Obtención de la emulsión

La emulsión se obtiene de modo discontinuo o continuo, de manera habitual, mezclando entre sí (dispersando) agua, monómeros, emulsionantes de Pickering, hidrofobina y, eventualmente, otros componentes. A su vez, las sustancias de aplicación se pueden agregar juntas o separadas, en un mismo momento o de manera sucesiva, de una vez o de modo discontinuo en varias porciones o
30 de modo continuo a lo largo de una función matemática, asimismo, dicha función puede ser lineal, ascendente, descendente, exponencial o escalonada.

Preferentemente, la hidrofobina se dispone como solución y se agrega el emulsionante de Pickering, preferentemente, como suspensión acuosa nueva; posteriormente se agrega agua si es necesario, para regular la relación de monómero y agua, y finalmente se agrega el monómero. La
35 mezcla obtenida es mezclada.

La mezcla se lleva a cabo de manera conocida, por ejemplo, por agitación, sacudido o mezcla turbulenta. Según el tipo y la cantidad de sustancias de aplicación utilizadas y del diámetro deseado de las gotitas de monómero en la emulsión pueden ser suficientes agitadores simples (por ejemplo, agitadores magnéticos, de hoja), accionados a 500 a 1000, preferentemente, 600 a 800
40 revoluciones por minuto (Rpm). sin embargo, también se pueden utilizar agitadores de alta velocidad, accionados habitualmente a 6000 a 10.000, especialmente, 9000 a 10.000 Rpm, por ejemplo, el Ultra-Turrax® de IKA.

De modo alternativo, también se puede efectuar la mezcla a través de otras operaciones de mezclado, por ejemplo, por inyección del monómero en agua o a la inversa, a través de oscilaciones y cavitación de la mezcla (por ejemplo, por ultrasonido), por centrifugadoras por emulsión, molinos coloidales u homogeneizadores.

Se puede realizar la mezcla en cualquier recipiente adecuado para ello, en el caso más sencillo, se trata de un recipiente agitado o un matraz redondo. También se pueden utilizar cascadas de recipientes agitados, reactores de tubos, mezcladores estáticos o dinámicos. Si es necesario,
50 pueden aplicarse placas de desviación para mejorar el mezclado.

La duración del mezclado con una entrada de energía reducida, en la mayoría de los casos es de 1 a 20 horas, preferentemente, 5 a 15 horas. En el caso de una entrada elevada de energía, el mezclado dura generalmente 60 a 300 seg, preferentemente, 60 a 120 seg. La temperatura durante la fabricación de la emulsión se encuentra, usualmente, entre 20 y 80 °C, preferentemente, entre 20 y 25
55 °C; la presión usualmente asciende a 1 a 3 bar, preferentemente, 1 a 2 bar. Sobre todo en el caso de

monómeros con un bajo punto de ebullición o una elevada presión de vapor también puede ser adecuado un trabajo a temperaturas y/o inferiores presiones superiores.

La duración de la mezcla, la presión y la temperatura se orientan, entre otros, al tipo y la cantidad de sustancias de aplicación utilizadas y el diámetro deseado de gotitas de monómeros.

5 Características de la emulsión y otros objetos de la invención

La emulsión acorde a la invención consiste en agua como fase continua y las gotitas de monómeros como fase dispersa. El tamaño de gotitas de monómeros puede variar ampliamente según el tipo y la cantidad de sustancias de aplicación y las condiciones de mezclado y es, usualmente, de 100 nm a 2000 μm , preferentemente, 800 nm a 1200 μm y, de modo especialmente preferido, 900 a 1000 μm , expresado como diámetro de partículas de media numérica d50 (cada 50 % de las partículas son menores o mayores que el diámetro de d50).

Las emulsiones son estables durante un tiempo prolongado, por ejemplo, varias horas, y no tienden a la formación de espuma.

En un modo de realización preferido, las emulsiones acordes a la invención están caracterizadas porque el monómero es estireno, las partículas inorgánicas contienen pirofosfato de magnesio y la hidrofobina es la descrita en la descripción en SEQ ID NO: 19.

También es objeto de la invención el procedimiento descrito anteriormente para la obtención de emulsiones, en donde los monómeros se dispersan en agua en presencia de partículas inorgánicas que actúan como emulsionante de Pickering, caracterizado porque también se utiliza hidrofobina.

Preferentemente, el procedimiento se caracteriza porque la emulsión presenta, al menos, una de las características de las reivindicaciones 1 a 8.

Otro objeto de la invención es la utilización de hidrofobina en la obtención de emulsiones de monómeros hidrófobos en agua. Preferentemente, el procedimiento se caracteriza porque la emulsión presenta, al menos, una de las características de las reivindicaciones 1 a 8.

Polimerización en suspensión para la obtención de partículas poliméricas

Al comienzo ya ha sido mencionado que las emulsiones acordes a la invención se pueden utilizar como sustancia de aplicación en una polimerización en suspensión. Dicha utilización también es objeto de la invención.

La presente invención también comprende un procedimiento para la polimerización en suspensión de monómeros hidrófobos en agua, utilizando asimismo partículas inorgánicas como emulsionantes de Pickering, caracterizado porque también se utiliza hidrofobina. Preferentemente, dicho procedimiento se caracteriza porque como sustancia de aplicación se utiliza una emulsión acorde a la invención, como la definida en las reivindicaciones 1 a 8.

Los procedimientos para la polimerización en suspensión son conocidas por el experto, por ejemplo, gracias al manual de plásticos Kunststoff-Handbuch, tomo V Polystyrol (Poliestireno), editorial Hanser, Múnich. En general, se utilizan iniciadores de polimerización usuales, que se disuelven en los monómeros. Dichos iniciadores son, por ejemplo, compuestos solubles en estireno, como terc-butilperbenzoato o peróxido de dibenzoilo. Usualmente se utilizan en cantidades de 0,001 a 10 % en peso en relación a la cantidad de monómero.

Asimismo, se pueden utilizar reguladores de peso molecular, como terc-dodecilmercaptano o α -metilestireno dímero, usualmente en cantidades de 0,001 a 0,01 % en peso, en relación a los monómeros. También los coloides protectores usuales pueden ser utilizados, por ejemplo, derivados de la celulosa, alcoholes de polivinilo, ácidos poliacrílicos, poliacrilamidas o polivinilpirrolidonas. Se utilizan en cantidades usuales. Sin embargo, se prefiere no utilizar ninguno de dichos coloides protectores.

La temperatura en la polimerización en suspensión es usualmente de 0 a 200, preferentemente, de 50 a 150° C. La presión generalmente se encuentra en 0,1 mbar a 50 bar, preferentemente, 0,8 bar a 20 bar.

En el transcurso de la polimerización en suspensión se polimerizan las gotitas de monómeros (usualmente líquidas) en partículas de monómeros (usualmente sólidas), y se obtiene una suspensión de partículas poliméricas en agua. El tamaño de partículas de la partícula polimérica

depende, entre otros, del tamaño de las gotitas de monómero y, en general, es de 800 a 2000, preferentemente, 900 a 1100 μm , expresado como diámetro de gotitas de media numérica d50 (cada 50 % de las partículas son menores o mayores que el diámetro de d50).

- 5 En la polimerización en suspensión se puede agregar un agente de expansión en la fabricación de partículas poliméricas que contienen agente de expansión; el tipo y la cantidad han sido indicados anteriormente. Para ello se polimeriza a una presión elevada, es decir, a más de 1 bar hasta a 50 bar, y a temperaturas de, por ejemplo, 50 a 150° C. De modo alternativo también se puede polimerizar primero sin agente de expansión y luego, en un segundo paso, exponer la suspensión de la partícula polimérica obtenida a la presión elevada y a temperatura elevada.
- 10 En el caso de las condiciones de presión y temperatura mencionadas, el agente de expansión se difunde en la partícula polimérica. Si la suspensión obtenida se refrigera bajo presión, de modo que el agente de expansión no pueda expandirse en la partícula, se obtiene una partícula polimérica expansible. Si la suspensión de partículas calentada se distiende abruptamente, el agente de propulsión se expande en las partículas blandas y se obtienen partículas expandidas. Es decir, que
- 15 las partículas poliméricas pueden ser expandidas o expansibles, según el procedimiento.

El objeto de la invención también es, por tanto, un procedimiento para la obtención de partículas poliméricas termoplásticas expansibles o expandidas, utilizando asimismo un agente de propulsión, **caracterizado porque** las partículas poliméricas son obtenidas con el procedimiento mencionada para la polimerización en suspensión.

- 20 Las partículas poliméricas expandidas o expansibles que se obtienen con dicho procedimiento también son objeto de la invención. A partir de ellas se pueden obtener, por ejemplo, espumas (las denominadas espumas de partículas) o cuerpos moldeados de espuma. El modo de proceder es conocido: para la obtención de poliestireno expandido (Styropor®) las partículas de poliestireno acordes a la invención, que contienen agente de expansión se pueden expandir
- 25 parcialmente primero, por ejemplo, en el espumado previo, por calentamiento. En el posterior proceso, denominado espumado, las partículas de poliestireno parcialmente expandidas son colocadas en un molde provisto de perforaciones finas, el molde es cerrado y mediante el ingreso por presión de vapor de agua o de otra manera se expanden las partículas, uniéndose formando entre sí espuma o una pieza moldeada acabada de espuma.
- 30 Por tanto, el objeto de la invención comprende también la utilización de las partículas poliméricas acordes a la invención, expansibles o expandidas, para la obtención de espumas o cuerpos moldeados de espuma. Por ello, se prefiere la utilización de partículas de poliestireno poliméricas acordes a la invención, expansibles o expandidas, para la obtención de espumas o
- 35 cuerpos moldeados de espuma, es decir, una utilización en la cual las partículas poliméricas son partículas de poliestireno y la espuma o los cuerpos moldeados de espuma son poliestireno expandido.

Ejemplos

PARTE A: Obtención y evaluación de la hidrofobina utilizada acorde a la invención

Ejemplo 1: Preparación para la clonación de yaad-His₆ / yaaE-His₆

- 40 Mediante los oligonucleótidos Hal570 y Hal571 (Hal 572/ Hal 573) se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa. Se utilizaron como ADN molde los ADN genómicos de la bacteria Bacillus subtilis. El fragmento PCR obtenido contenía la secuencia codificada del gen yaad / yaaE de Bacillus subtilis, y en cada extremo, respectivamente, un sitio de restricción NcoI o BgIII. El fragmento PCR fue purificado y cortado con las endonucleasas de restricción NcoI y BgIII. Dicho
- 45 fragmento de ADN se utilizó como inserto, y el vector pQE60, de la empresa Qiagen, linearizado previamente con las endonucleasas de restricción NcoI y BgIII. Los vectores pQE60YAAD#2 / pQE60YaaE#5 originados en ese momento pueden ser utilizados para la expresión de proteínas que consisten en YAAD::HIS₆ o YAAE::HIS₆

Hal570: gcgcgcccatggctcaaacagggtactga

- 50 Hal571: gcagatctccagccggttcttcatac

Hal572: ggccatgggattaacaataggtgtactagg

Hal573: gcagatcttacaagtgccctttgcttatattcc

Ejemplo 2: Clonación de hidrofobina yaad DewA-His₆

Mediante los oligonucleótidos KaM 416 y KaM 417 se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa. Se utilizaron como ADN molde los ADN genómicos del hongo filamentoso *Aspergillus nidulans*. El fragmento PCR obtenido contenía la secuencia codificada de la hidrofobina *dewA* y una interfaz de proteinasa de factor Xa N-terminal. El fragmento PCR fue purificado y cortado con la endonucleasa de restricción BamHI. Dicho fragmento de ADN se utilizó como inserto, y el vector pQE60YAAD#2, linearizado previamente con la endonucleasa de restricción BglII.

El vector así #508 obtenido puede ser utilizado para la expresión de una proteína de fusión que consiste en YAAD::Xa::dewA::HIS₆.

KaM416: GCAGCCCATCAGGGATCCCTCAGCCTTGGTACCAGCGC

**KaM417: CCCGTAGCTAGTGGATCCATTGAAGGCCGCAT-
GAAGTTCTCCGTCTCCGC**

Ejemplo 3: Clonación de hidrofobina yaad RodA-His₆

La clonación del plásmido #513 se llevó a cabo de modo análogo al plásmido #508, utilizando los oligonucleótidos KaM 434 y KaM 435.

KaM434: GCTAAGCGGATCCATTGAAGGCCGCATGAAGTTCTCCATTGCTGC

KaM435: CCAATGGGGATCCGAGGATGGAGCCAAGGG

Ejemplo 4: Clonación de hidrofobina yaad BASF1-His₆

La clonación del plásmido #507 se llevó a cabo de modo análogo al plásmido #508, utilizando los oligonucleótidos KaM 417 y KaM 418.

Como ADN molde se utilizó una secuencia de hidrofobina BASF1 sintetizada artificialmente (ver anexo).

**KaM417:CCCGTAGCTAGTGGATCCATTGAAGGCCGCAT-
GAAGTTCTCCGTCTCCGC**

KaM418: CTGCCATTCAGGGGATCCCATATGGAGGAGGGAGACAG

Ejemplo 5: Clonación de hidrofobina yaad BASF2-His₆

La clonación del plásmido #506 se llevó a cabo de modo análogo al plásmido #508, utilizando los oligonucleótidos KaM 417 y KaM 418.

Como ADN molde se utilizó una secuencia de hidrofobina BASF2 sintetizada artificialmente (ver anexo).

**KaM417:CCCGTAGCTAGTGGATCCATTGAAGGCCGCAT-
GAAGTTCTCCGTCTCCGC**

KaM418: CTGCCATTCAGGGGATCCCATATGGAGGAGGGAGACAG

Ejemplo 6: Clonación de hidrofobina yaad SC3-His₆

La clonación del plásmido #526 se llevó a cabo de modo análogo al plásmido #508, utilizando los oligonucleótidos KaM464 y KaM465.

Como ADN molde se utilizó ADNc de *Schizophyllum commune* (ver anexo).

KaM464: CGTTAAGGATCCGAGGATGTTGATGGGGGTGC

KaM465: GCTAACAGATCTATGTTCCGCCGTCTCCCCGTCGT

Ejemplo 7: Fermentación de la cepa recombinante E.coli hidrofobina yaad DewA-His₆

Inoculación de 3 ml de medio LB líquido con una cepa de E.coli que expresa una hidrofobina yaad DewA-His₆, en tubos Greiner de 15 ml. Incubación durante 8 h a 37 °C en un agitador de 200 Rpm. 2 matraces de Erlenmeyer de 1l con chicana y 250 ml de medio LB (+ 100 µg/ml de ampicilina) se inoculan con, respectivamente, 1 ml de cultivo previo y se incubaron durante 9 h a 37 °C en un agitador de 180 Rpm.

Inocular 13,5 l de medio LB (+100µg/ml de ampicilina) en un fermentador de 20 l con 0,5 l de cultivo previo (OD_{600nm} 1:10 medido contra H₂O). En OD_{60nm} de -3,5 agregar 140 ml de 100 mM de IPTG. Tras 3 h, refrigerar el fermentador a 10°C y centrifugar el caldo de fermentación. Utilizar el residuo (pellet) celular para una purificación adicional.

Ejemplo 8: Limpieza de la proteína de fusión de hidrofobina recombinante (purificación de las proteínas de fusión de hidrofobina que presentan un His₆-tag C-terminal)

100 g de residuo celular (100 - 500 mg de hidrofobina) se completan con 50 mM de búfer de fosfato de sodio, pH 7,5, a un volumen total de 200 ml y se resuspenden. La suspensión se trata durante 10 minutos con un Ultraturax de tipo T25 (Janke und Kunkel; IKA-Labortechnik) y posteriormente se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con 500 unidades de benzonasa (Merck, Darmstadt; N° de pedido: 1.01697.0001) para descomponer los ácidos nucleicos. Antes de la disolución celular se filza con un cartucho de vidrio (P1). Para la disolución celular y el cizallado de los ADN genómicos restantes se llevan a cabo dos procesos de homogeneizador a 1 500 bar (Microfluidizer M-110EH; Microfluidics Corp.). El producto de homogeneización se centrifuga (Sorvall RC-5B, rotor GSA, vaso de centrifuga de 250 ml, 60 minutos, 4° C, 12 000 rpm, 23.000 g), el excedente es colocado sobre hielo y el pellet es resuspendido en 100 ml de búfer de fosfato de sodio, pH 7,5. La centrifugación y la resuspensión se repiten tres veces, asimismo, en la tercera repetición el búfer de fosfato de sodio contiene 1 % de SDS. Tras la resuspensión se agita durante una hora y se lleva a cabo una centrifugación final (Sorvall RC-5B, rotor GSA, vaso de centrifuga de 250 ml, 60 minutos, 4° C, 12.000 rpm, 23.000 g). Acorde al análisis SDS-PAGE, tras la centrifugación final (imagen 1) la hidrofobina se obtiene en el excedente. Las pruebas demuestran que probablemente la hidrofobina se encuentra en forma de cuerpo de inclusión en las correspondientes células de E.coli. 50 ml del excedente que contiene hidrofobina son aplicados sobre una columna de 50 ml de níquel-sefarosa de alto rendimiento 17-5268-02 (Amersham), equilibrada con 50 mM de búfer de tris-Cl pH 8,0. La columna es lavada con 50 mM de búfer de tris-Cl pH 8,0 y la hidrofobina se aluye posteriormente con 50 mM de búfer de tris-Cl pH 8,0, que contiene 200 mM de imidazol. Para extraer el imidazol se dializa la solución contra 50 mM de búfer tris-Cl pH 8,0.

La imagen 1 muestra la purificación de la hidrofobina obtenida:

Huella 1: Aplicación sobre la columna de níquel-sefarosa (dilución de 1:10) Huella 2: pasaje = eluato paso de lavado

Huellas 3 - 5: OD 280 máximos de las fracciones de elución

La hidrofobina de la imagen 1 presenta un peso molecular de, aproximadamente, 53 kD. Las cintas más delgadas representan, en parte, los productos de desintegración de la hidrofobina.

Ejemplo 9: Evaluación de aplicación técnica; caracterización de la hidrofobina a través de la modificación del ángulo de contacto de una gota de agua sobre vidrio.

- Sustrato: vidrio (vidrio de ventana, Süddeutsche Glas, Mannheim):

- Concentración de la hidrofobina: 100 Pg/mL

- Incubación de plaquetas de vidrio durante la noche (temperatura: 80° C) en 50mM de acetato de Na pH 4 + 0, 1 % de monolaureato de polioxietileno (20) sorbitan (Tween®.20)

- luego, lavar el revestimiento en agua destilada

- posteriormente, incubación durante 10min / 80° C / en una solución en agua destilada al 1 % de dodecilsulfato de sodio (SDS).

- lavar en agua destilada

Las muestras se secaron al aire a 20° C y el se determinó el ángulo de contacto (en grados) de una gota de 5 µl de agua a temperatura ambiente.

La medición del ángulo de contacto se determinó en un equipo Dataphysics Contact Angle System OCA 15+, software SCA 20.2.0. (noviembre de 2002). La medición se llevó a cabo acorde a las indicaciones del fabricante.

5 El vidrio no tratado presentó un ángulo de contacto de $30 \pm 5^\circ$; un revestimiento con la hidrofobina funcional acorde al ejemplo 8 (yaad-dewA-his₆) presentó un ángulo de $75 \pm 5^\circ$.

PARTE B: Emulsión que contiene hidrofobina

Ejemplo 10: Fabricación y análisis de una emulsión de estireno en agua

10 Se utilizó agua desionizada. Para la fabricación de la emulsión acorde a la invención se utilizó una solución de la hidrofobina obtenida acorde al ejemplo 8 (proteína de fusión) yaad-Xa-dewA-his (SEQ ID NO: 19) en agua. La concentración de la hidrofobina en la solución fue de 100 mg/l (0,02 % en peso).

15 Como emulsionante de Pickering se utilizó pirofosfato de magnesio (MPP) como suspensión acuosa, obtenida del siguiente modo: a 20° C se disolvieron 93,18 g de pirofosfato de sodio (Na₄P₂O₇) en 3200 ml de agua. A dicha solución se agregó bajo agitación una solución de 172,8 g de sulfato de magnesio (MgSO₄ • 7 H₂O) en 800 ml de agua y se agitó otros 5 min.

20 Se utilizó una botella de boca ancha de 50 ml, provista de un agitador magnético un una varilla de agitación revestida con Teflon®. a 20° C y sin agitar se dispusieron 0,3 a 1,2 g de la solución de hidrofobina, se agregaron 1,5 a 2,5 g de suspensión MPP nueva y 15 a 20 g de agua. Dicha mezcla se agitó durante 30 seg a 700 rpm. Luego se agregaron 30 g de estireno. Las cantidades precisas de solución de hidrofobina, suspensión de MPP y agua se seleccionaron de modo tal que en la mezcla obtenida la relación de volumen de fases de estireno:agua sea de 1,3 y la proporción de MPP sea de 780 ppmw. La proporción de hidrofobina de la mezcla está indicada en la siguiente tabla.

La mezcla obtenida se agitó durante 17 horas a 700 rpm. Luego se dejó reposar durante dos horas y se fotografió la mezcla obtenida.

25 La estabilidad de la mezcla o emulsión se analizó mediante dilución con estireno o agua. Para ello se agregó una muestra de 0,1 ml de la muestra a la mezcla, a 20° C, a 0,1 ml de estireno o 0,1 ml de agua y se observó si era posible una mezcla. Además, a partir de las fotografías se determinó el tamaño aproximado de las gotas de estireno.

La tabla reúne los resultados.

30 Tabla: resultados (V significa para comparación, nd, no determinado)

Ejemplo	proporción de hidrofobina [ppmw]	caracterización de la mezcla	tamaño de las gotitas de estireno
10-1V	0	sin emulsión	-
10-2	21	emulsión inestable	nd
10-3	42	emulsión estable	algunos mm
10-4	84	emulsión estable	rango de μm y mm

Correspondencia de los nombres de las secuencias a las secuencias de ADN y de polipéptidos en el protocolo de secuencia

secuencia de ADN y polipéptidos dewA	SEQ ID NO: 1
secuencia de polipéptidos dewA	SEQ ID NO: 2
secuencia de ADN y polipéptidos rodA	SEQ ID NO: 3
secuencia de polipéptidos rodA	SEQ ID NO: 4
secuencia de ADN y polipéptidos hypA	SEQ ID NO: 5

ES 2 353 816 T3

secuencia de polipéptidos hypA	SEQ ID NO: 6
secuencia de ADN y polipéptidos hypB	SEQ ID NO: 7
secuencia de polipéptidos hypB	SEQ ID NO: 8
secuencia de ADN y polipéptidos sc3	SEQ ID NO: 9
secuencia de polipéptidos sc3	SEQ ID NO: 10
secuencia de ADN y polipéptidos Basf1	SEQ ID NO: 11
secuencia de polipéptidos Basf1	SEQ ID NO: 12
secuencia de ADN y polipéptidos Basf2	SEQ ID NO: 13
secuencia de polipéptidos basf2	SEQ ID NO: 14
secuencia de ADN y polipéptidos yaad	SEQ ID NO: 15
secuencia de polipéptidos yaad	SEQ ID NO: 16
secuencia de ADN y polipéptidos yaae	SEQ ID NO: 17
secuencia de polipéptidos yaae	SEQ ID NO: 18
secuencia de ADN y polipéptidos yaad-Xa-dewA-his	SEQ ID NO: 19
secuencia de polipéptidos yaad-Xa-dewA-his	SEQ ID NO: 20
secuencia de ADN y polipéptidos yaad-Xa-rodA-his	SEQ ID NO: 21
secuencia de polipéptidos yaad-Xa-rodA-his	SEQ ID NO: 22
secuencia de ADN y polipéptidos yaad-Xa-basf1-his	SEQ ID NO: 23
secuencia de polipéptidos yaad-Xa-basf1-his	SEQ ID NO: 24

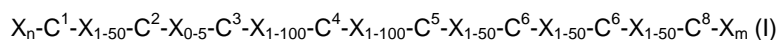
REIVINDICACIONES

1. Emulsiones de monómeros hidrófobos en agua, que contienen partículas inorgánicas como emulsionantes de Pickering, e hidrofobina.

2. Emulsiones acordes a la reivindicación 1, **caracterizadas porque** el monómero es estireno, en donde se pueden utilizar comonómeros seleccionados entre α -metilestireno, estirenos de núcleo halogenado, estirenos de núcleo alquilado, acrilnitrilo, ésteres de ácido acrílico o ácido metacrílico de alcoholes C₁₋₈, compuestos N-vinilo, butadieno, divinilbenceno o diacrilato de butanodiol.

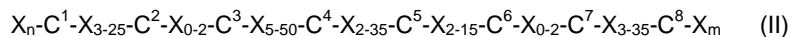
3. Emulsiones acordes a una de las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizadas porque** las partículas inorgánicas están seleccionadas entre partículas que contienen pirofosfato de magnesio, sulfato de bario, óxido de zinc y fosfato de calcio.

4. Emulsiones acordes a las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizadas porque** la hidrofobina presenta la fórmula general (I)



en donde X representa cada uno de los 20 aminoácidos naturales que existen (Phe, Leu, Ser, Tyr, Cys, Trp, Pro, His, Gln, Arg, Ile, Met, Thr, Asn, Lys, Val, Ala, Asp, Glu, Gly) y las X pueden ser, respectivamente, Iguales o diferentes, los índices junto a X representan la cantidad de aminoácidos, C es cisteína, alanina, serina, glicina, metionina o treonina, en donde, al menos, cuatro de los radicales identificados con C representan cisteína, los índices n y m representan, independientemente entre sí, números naturales de 0 a 500.

5. Emulsiones acordes a las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizadas porque** la hidrofobina presenta la fórmula general (II)



en donde X, C y los índices que se encuentra junto a X presentan los significados indicados en la reivindicación 4, y los índices n y m son, independientemente entre sí, números naturales de 0 a 300.

6. Emulsiones acordes a una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizadas porque** la hidrofobina está seleccionada entre los tipos dewA, rodA, hypA, hypB, sc3, basf1 y basf2.

7. Emulsiones acorde a las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizadas porque** el monómero es estireno, las partículas inorgánicas contienen pirofosfato de magnesio y la hidrofobina es la descrita en la descripción en SEQ ID NO: 19.

8. Emulsiones acordes a las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizadas porque** no contienen emulsionantes orgánicos o tensioactivos.

9. Procedimiento para la obtención de emulsiones acorde a las reivindicaciones 1 a 8, en donde los monómeros se dispersan en agua en presencia de partículas inorgánicas que actúan como emulsionante de Pickering, **caracterizado porque** también se utiliza hidrofobina.

10. Procedimiento acorde a la reivindicación 9, **caracterizado porque** la emulsión presenta, al menos, una de las características de las reivindicaciones 1 a 8.

11. Utilización de hidrofobina en la obtención de emulsiones de monómeros hidrófobos en agua.

12. Aplicación acorde a la reivindicación 11, **caracterizada porque** la emulsión presenta, al menos, una de las características de las reivindicaciones 1 a 8.

13. Procedimiento para la polimerización en suspensión de monómeros hidrófobos en agua utilizando asimismo partículas inorgánicas como emulsionantes de Pickering, **caracterizado porque** también se utiliza hidrofobina.

14. Procedimiento acorde a la reivindicación 13, **caracterizado porque** como sustancia de aplicación se utiliza una emulsión como la definida en las reivindicaciones 1 a 8.

15. Aplicación de la emulsión acorde a las reivindicaciones 1 a 8 como sustancia de aplicación en una polimerización de suspensión.

16. Procedimiento para la obtención de partículas poliméricas termoplásticas expansibles o expandidas utilizando asimismo un agente de expansión, **caracterizado porque** las partículas poliméricas son obtenidas con el procedimiento acorde a la reivindicación 13.

“Sigue 1 página de dibujos”

5

Imagen 1

