



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 289 824**

(51) Int. Cl.:
C12N 15/00 (2006.01)
C12N 9/96 (2006.01)
C07K 1/06 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **99947259 .0**
(86) Fecha de presentación : **12.10.1999**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1124946**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **22.08.2001**

(54) Título: **Proteínas glicosiladas con alergenicidad reducida.**

(30) Prioridad: **30.10.1998 DK 1998 01401**
25.11.1998 DK 1998 01551
17.05.1999 DK 1999 00682
04.10.1999 DK 1999 01419

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.02.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.02.2008

(73) Titular/es: **Novozymes A/S**
Krogshøjvej 36
2880 Bagsvaerd, DK

(72) Inventor/es: **Olsen, Arne, Agerlin;**
Roggen, Erwin, Ludo y
Ernst, Steffen

(74) Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

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

Proteínas glicosiladas con alergenicidad reducida.

5 La presente invención se refiere al campo de la inmunología, en particular a la alergenicidad. Más específicamente se refiere a la reducción de la alergenicidad por la N-glicosilación *in vivo* de proteínas. Antecedentes de la invención

10 Las proteínas, incluidas las enzimas, son producidas a gran escala industrial para la aplicación en una variedad de campos industriales. Hoy en día, las industrias de los detergentes, de los alimentos así como las farmacéuticas están beneficiándose del desarrollo de proteínas modernas y de tecnologías enzimáticas. No obstante, un inconveniente mayor en relación con la exposición aumentada a las proteínas es el riesgo de respuestas alérgicas en individuos susceptibles.

15 La prevención de alergias en individuos susceptibles es, por lo tanto, un área de investigación de gran importancia. El mecanismo general detrás de una respuesta alérgica está dividido en una fase de sensibilización y una fase sintomática. La fase de sensibilización implica una primera exposición de un individuo a un alérgeno. Este evento activa los linfocitos T y B, y conduce a la producción de anticuerpos alérgenos específicos de la inmunoglobulina E (IgE). La fase sintomática es iniciada por una segunda exposición al mismo antígeno o a uno parecido. Los anticuerpos IgE específicos se enlazan entre otros a los receptores de IgE específicos en los mastocitos y basófilos, mientras que capturan simultáneamente al alérgeno. La naturaleza policlonal de este proceso resulta en la conexión y el agrupamiento de los receptores IgE, y posteriormente en la activación de los mastocitos y basófilos. Sucesivamente esta activación activa la liberación de varios mediadores químicos implicados en las reacciones de fase temprana así como tardía de la fase sintomática. Parece que existe una correlación entre el grado de unión a la IgE y la gravedad de la reacción alérgica. En este contexto la denominación de los anticuerpos sigue a la denominación estándar, es decir la IgE es de 25 inmunoglobulina E y así sucesivamente.

30 Antes de que la respuesta inmunitaria anteriormente mencionada entre en juego, el cuerpo tratará de eliminar los invasores por mecanismos no específicos. En los pulmones e hígado, por ejemplo, y probablemente también en la piel, los macrófagos funcionan como fagocitos. Los fagocitos son células fagocíticamente activas que están equipadas para capturar y digerir antígenos exteriores, por ejemplo bacterias. Para mejorar su eficacia captadora éstas expresan en su superficie receptores scavenger al igual que receptores ricos en manosa, a los cuales se unen estructuras aniónicas y con contenido en manosa normalmente expresadas en la superficie bacteriana.

35 Se cree que la reducción de la unión del epítipo específico preexistente libre y unido a la célula, al igual que la reacción cruzada de anticuerpos IgE, y la reducción de la producción de anticuerpos IgE aumentando el reconocimiento de antígenos por las células fagocíticas son factores que ayudarán al cuerpo a controlar una reacción alérgica a las proteínas.

40 Una forma de conseguirlo es modificar la proteína responsable de la reacción alérgica. Tales modificaciones de la proteína han sido descritas en la técnica anterior. En WO 96/17929, WO 97/30148 y WO 98/35026, las proteínas fueron modificadas químicamente mediante la adición de polietilenglicol. Los antígenos pueden ser alterados químicamente para reducir la unión por los anticuerpos. Los derivados de los antígenos revelaron una unión reducida de anticuerpos específicos, una antigenicidad reducida como se indica por la producción de anticuerpos IgG1, y básicamente ninguna alergenicidad según está sugerido por la ausencia de niveles de anticuerpos IgE específicos detectables.

45 El proceso de modificar químicamente proteínas, es decir por PEG- ilación, aunque es eficaz, es más bien largo y por lo tanto costoso. La presente invención revela un método para optimizar la modificación *in vivo* de proteínas con oligómeros de glicosilo con el objetivo de reducir la alergenicidad de las proteínas. Este enfoque puede reducir cinco veces los costes de producción.

50 WO 98/1337 describe un método por el cual la absorción de péptidos solubles por células dendríticas es mejorada por la adición de residuos de manosa a los péptidos. Esto ilustra claramente que es posible manipular una respuesta inmunitaria a un antígeno soluble mediante la adición química de azúcares, tales como la manosa.

55 US A 5,041,376 expone un método para identificar o proteger sitios funcionales o epítipos mediante la introducción de un único sitio de N-glicosilación adicional no nativo. Entre una gama de métodos para valorar las propiedades estructurales y enzimáticas de las variantes glicosiladas, esta patente utiliza un ensayo de anticuerpos monoclonales para evaluar si la introducción de un sitio de glicosilación tiene una unión a anticuerpos reducida.

60 Babiker *et al*, J. Agric. Food Chem. 1998, 46, 866-871, describe un conjugado de proteína de soja-galactomanano preparado por la reacción de Maillard la cual eliminó la alergenicidad de la proteína de 34 kDa que es frecuentemente reconocida por el anticuerpo IgE en los sueros de pacientes sensibles a la semilla de soja como un alérgeno mayor.

65 En este contexto, los términos alergia, alérgico y alergenicidad se utilizan según sus definiciones usuales, es decir para describir la reacción debida a las respuestas inmunológicas en las cuales el anticuerpo más común es la IgE, menos frecuentemente la IgG4 y las enfermedades debidas a estas respuestas inmunológicas. Las enfermedades alérgicas incluyen urticaria, fiebre del heno, asma, y dermatitis atópica. Ocasionalmente, estas enfermedades pueden desembocar en un shock anafiláctico.

Resumen de la invención

Esta invención se refiere a un método según la reivindicación 1.

5 Otras formas de realización del método están establecidas en las reivindicaciones 2 a 10.

Así en una forma de realización de la presente invención la alergenicidad de la variante de la proteína glicosilada es inferior al 50%, preferiblemente inferior al 25%, más preferiblemente inferior al 1% de la alergenicidad de la proteína progenitora tal y como se define en la reivindicación 1.

10 Se puede producir por el método de la invención una variante de la proteína glicosilada con al menos un sitio de glicosilación adicional que permita la protección de al menos un epítipo de la proteína precursora, dicha variante de la proteína glicosilada presentando sustancialmente la misma funcionalidad que la proteína precursora.

Figuras

La Figura 1 muestra la imagen en 3D de dos variantes construidas de la lipolasa.

20 La Figura 2 es un gel que muestra una lipolasa de tipo salvaje y las dos variantes de la lipolasa representadas en la figura 1.

La Figura 3 muestra la respuesta del anticuerpo integrado en el modelo IT de rata.

25 Figura 4 muestra el nivel de respuesta de los anticuerpos integrados en el modelo sc de ratón.

Descripción detallada de la invención

30 El objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo método para producir proteínas con alergenicidad reducida mediante la glicosilación *in vivo*. Este objeto es conseguido por la construcción de una molécula de ADN que codifica la variante proteica, donde la molécula de ADN tiene al menos una subsecuencia que codifica un sitio de glicosilación adicional.

35 La esencia de la presente invención es que la glicosilación proporcione un antígeno soluble con sitios de fijación para la unión por los macrófagos residentes p. ej. los macrófagos alveolares del pulmón. La glicosilación introduce nuevos epítopos pero rara vez, si alguna, los anticuerpos glicosil-específicos pertenecen a la clase IgE. Al contrario, la unión por macrófagos redirige la respuesta inmunológica específica al antígeno lejos de una respuesta alérgica.

40 Al mismo tiempo, la glicosilación proporciona protección del antígeno desde los anticuerpos circulantes capaces de reaccionar con la parte proteica del antígeno. La protección de los epítopos para IgE contribuye a una reducción en la alergenicidad. Mediante el término protección se entiende que la cadena de glicosilo de la proteína glicosilada físicamente está "cubriendo" al menos un epítipo de la proteína progenitora. Esta protección, o cubrimiento previene el reconocimiento por los anticuerpos específicos del epítipo. La eficacia de la unión por macrófagos al igual que el grado al que los epítopos son protegidos de ser reconocidos por los anticuerpos, es decir si uno o más epítopos son
45 protegidos dependen en su totalidad de la naturaleza de la cadena de glicosilo, es decir de la complejidad y contenido en manosa de la cadena de glicosilo, y de si la cadena de glicosilo es ramificada o lineal.

50 El inventor de la presente invención ha encontrado de forma sorprendente que usando el método reivindicado, que incluye la glicosilación *in vivo* de proteínas, la alergenicidad de las proteínas es inmensamente reducida cuando se determina después de la exposición intratraqueal, pero que la alergenicidad de las proteínas es reducida hasta una extensión mucho inferior cuando se determina después de la exposición subcutánea, indicando que el mecanismo de la alergenicidad reducida puede ser dominado por los macrófagos residentes en el pulmón alveolar. Se concluye que con la utilización del presente método para producir una proteína glicosilada es posible conseguir un rendimiento más alto de un producto final con una alergenicidad reducida en comparación con las modificaciones convencionales de
55 proteínas de la técnica química anterior. Esto se debe al hecho de que hasta el producto final es producido *in vivo* y en consecuencia no requiere modificación *in vitro* ni purificación.

60 Según la presente invención la variante de la proteína glicosilada producida es una variante de la proteína N-glicosilada. La N-glicosilación se encuentra en sitios de la secuencia Asn-Xaa-Ser, Asn-Xaa-Thr, o Asn-Xaa-Cys, donde ni el residuo de Xaa ni el aminoácido según la secuencia de consenso tripeptídica es una prolina (T.E. Creighton, "Proteins-Structures and Molecular Properties", 2ª edición, W.H. Freeman y Co., Nueva York, 1993, págs. 91-93). Es por lo tanto deseable introducir sitios de reconocimiento de este tipo en la secuencia de la proteína progenitora. La naturaleza específica de la cadena de glicosilo de la variante de la proteína glicosilada puede ser lineal o ramificada dependiendo de los requisitos específicos y de las propiedades de la variante de la proteína.

65 Una característica importante de la presente invención es que la variante de la proteína glicosilada muestra sustancialmente la misma funcionalidad que la proteína progenitora.

El término “sustancialmente la misma funcionalidad” indica una variante de la proteína como un análogo estructural de la proteína progenitora con funciones biológicas equivalentes o incluso mejores que tienen una modificación de la glicosilación al compararse con la proteína progenitora. Es posible valorar si las modificaciones interferirán sustancialmente con la funcionalidad de la variante de la proteína bien moldeando por ordenador las sustituciones deseadas o midiendo la actividad biológica de la variante de la proteína glicosilada, p. ej. la actividad enzimática de una proteína glicosilada.

En otro aspecto de la presente invención la alergenicidad de la variante de la proteína glicosilada es al menos un 50% inferior a la alergenicidad de la proteína progenitora expresada como los niveles de los anticuerpos IgE desarrollados en animales apropiadamente expuestos al antígeno tal y como se define en la Reivindicación 1. Preferiblemente por lo tanto la alergenicidad de la variante de la proteína en los animales de la experimentación es sustancialmente inexistente cuando se compara con la alergenicidad del tipo salvaje.

Además de la reducción de la alergenicidad provocada por el reconocimiento por los macrófagos de las variantes de la proteína glicosilada con el(los) grupo(s) de glicosilación adicional, la glicosilación adicional puede proteger al menos un epítipo de superficie de la proteína conduciendo a una antigenicidad reducida y por lo tanto, la posibilidad de una reducción adicional de la alergenicidad.

En este contexto, un “epítipo de superficie” debe ser entendido como una pequeña región en una superficie de la proteína que es reconocida y unida por anticuerpos específicos para esta proteína.

Según la presente invención, la reducción en la unión de anticuerpos a la variante de la proteína puede ser al menos una reducción del 30% en la unión de anticuerpos, preferiblemente una reducción del 45% en la unión de anticuerpos, con la condición de que la función de la variante de la proteína no sea perjudicada sustancialmente. La reducción de la unión de anticuerpos puede ser medida usando un ELISA competitivo.

Para aumentar el efecto de la protección del epítipo de los sitios de glicosilación adicionales, estos pueden ser introducidos preferiblemente en la proximidad de los epítipos en la superficie de la proteína.

La identificación del(los) epítipo(s) puede ser conseguida por métodos establecidos tales como los descritos en WO 92/10755 (por U. Lovborg), por Walshet *et al.*, J. Immunol. Methods, vol. 121, 1275-280, 1989 y por Schoofs *et al.* J. Immunol. vol. 140, 611-616, 1987, Kohlman *et al.*, Protein Science, Vol. 8 (Supl. 2), página 68, 1999.

En un modo preferible, la identificación del(los) epítipo(s) puede ser conseguida mediante la selección de las bibliotecas presentadas en los fagos. Un fago es un virus que infecta a las bacterias. El principio detrás de la presentación en los fagos es que una secuencia de ADN heteróloga puede ser insertada en el gen que codifica para una proteína de revestimiento del fago. El fago hará y presentará la proteína híbrida en su superficie donde puede interactuar con agentes diana específicos. Este agente diana puede ser un anticuerpo epítipo-específico. En consecuencia, es posible seleccionar los fagos específicos de la masa a granel de millones de fagos, cada uno expresando su propia proteína híbrida. Una biblioteca de envoltura de expresión de péptidos aleatorios es una biblioteca que presenta péptidos de longitudes predeterminadas, por ejemplo de 9 aminoácidos de largo. Los péptidos de las proteínas híbridas de los fagos específicos que se enlazan a anticuerpos proteína-específicos definen los epítipos de esta proteína progenitora particular. Los residuos correspondientes de la proteína progenitora pueden ser encontrados comparando las secuencias peptídicas seleccionadas con la secuencia de aminoácidos y la estructura tridimensional de la proteína progenitora. Para aumentar el efecto protector de los grupos de glicosilación adicionales estos pueden ser introducidos cerca de los epítipos de superficie identificados de esta manera.

Descubrimiento de las sustituciones adecuadas

En el momento de la elección de las sustituciones adecuadas para introducir sitios de N-glicosilación, es deseable buscar los residuos Asn, Ser, Thr, o Cys que podrían ser parte de una secuencia de consenso Asn-Xaa-Ser/Thr/Cys. La compleción de la secuencia de consenso por mutagénesis sitio dirigida requerirá sólo una sustitución, y será por lo tanto menos perjudicial para el doblamiento y la función de las proteínas. Además, el molde por ordenador puede ser empleado para asegurar que las sustituciones de aminoácidos conducen a variantes de proteínas estables. Generalmente, se prefieren las sustituciones conservadoras, y las sustituciones que conducirán a que la cadena lateral del residuo Asn de la secuencia de consenso de la glicosilación sea accesible al solvente. La accesibilidad al solvente de las cadenas laterales de los aminoácidos puede ser determinada aplicando el programa informático DSSP a la parte pertinente de la estructura de la proteína. El programa DSSP está descrito en W. Kabsch y C. Sander, BIOPOLYMERS 22 (1983) págs. 2577-2637.

En el caso de elegir las sustituciones que están destinadas a proteger un epítipo identificado, se puede evaluar mediante el molde por ordenador mediante técnicas estándares, cómo se predice que la fracción de carbohidrato enlazada en N protege el epítipo en cuestión. Existen diferentes paquetes de software los cuales pueden ser empleados para hacer esta evaluación. Un ejemplo es el Insight Suite del software de molde de MSI, Inc.

En una forma de realización preferida de la invención, se introduce más de un sitio de glicosilación adicional. En este caso, puede ser difícil valorar *a priori* en qué medida la funcionalidad de la proteína es mantenida mientras que la antigenicidad y/o alergenicidad es reducida. Esto puede conseguirse estableciendo una biblioteca de mutantes diver-

sificados cada una con uno o más sitios de glicosilación adicionales introducidos y seleccionando aquellas variantes que muestren buena retención de la función y al mismo tiempo una buena reducción de la antigenicidad. En el caso de la lipasa, esto puede ser demostrado evaluando las variantes de la lipasa glicosiladas segregadas para la actividad enzimática y la unión de antígenos mediante un ELISA competitivo, como se describe más abajo en la sección experimental, no obstante, el objetivo de la invención no está de ninguna manera limitado a la lipasa, la cual sirve sólo como ejemplo. Una biblioteca diversificada puede ser establecida por una gama de técnicas conocidas por un experto en la materia (Reetz MT, Jarger KE; *Biocatalysis*, Discovery to Application editado por Fessner WD, Vol. 200, págs. 31-57, 1999, Stemmer, *Nature*, vol. 370, págs. 389-391, 1994, o Zhao y Arnold, *Proc. Natl. Acad. Sci.; USA*, vol. 94, págs. 7997-8000, 1997 o Yano *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, vol. 95, págs. 5511-5515, 1998). En una forma de realización más preferida, las sustituciones se encuentran gracias a un método que comprende las fases siguientes: 1) una gama de sitios de glicosilación adicional son catalogados; 2) una biblioteca es diseñada la cual introduce un subconjunto aleatorizado de estos sitios de glicosilación adicional en el gen diana; 3) la biblioteca es expresada, y las variantes preferidas son seleccionadas. En una forma de realización más preferida, este método es suplementado con ciclos adicionales de selección y/o redistribución de familias de compuestos activos desde el primer ciclo de la selección (J.E. Ness, *et al.*, *Nature Biotechnology*, Vol. 17, págs. 893-896, 1999) y/o combinación con otros métodos de reducción de la alergenicidad por medios genéticos (tal y como se describe en WO 92/10755).

La proteína progenitora puede ser cualquier proteína. El término proteína progenitora incluye cualquier proteína, tal como una proteína tipo salvaje o una variante de la misma que tiene una funcionalidad idéntica a la proteína progenitora.

Polipéptidos farmacéuticos

El término "polipéptidos farmacéuticos" está definido como polipéptidos, incluidos los péptidos, tales como hormonas peptídicas, proteínas y/o enzimas, estando fisiológicamente activas cuando se introducen en el sistema circulatorio del cuerpo de seres humanos y/o animales. Los polipéptidos farmacéuticos son potencialmente inmunogénicos cuando se introducen en el sistema circulatorio. Ejemplos de "polipéptidos farmacéuticos" contemplados según la invención incluyen insulina, ACTH, glucagón, somatostatina, somatotropina, timosina, hormona paratiroidea, hormonas pigmentarias, somatomedina, eritropoyetina, hormona luteinizante, gonadotropina coriónica, factores de liberación hipotálmica, hormonas antidiuréticas, hormona estimuladora de la tiroides, relaxina, interferón, trombopoyetina (TPO) y prolactina.

Por consiguiente, el método según la invención puede ser aplicado a proteínas usadas con fines industriales, tales como las enzimas.

En una forma de realización preferida de la invención la proteína progenitora es una enzima y puede ser seleccionada del grupo de enzimas que consiste en proteasas, lipasas, fitasas, liasas polisacáridas, oxidorreductasas, transglutaminasas, glicosil hidrolasas, y glicosaisomerases, en particular tal y como se menciona a continuación.

Proteasas progenitoras

Las proteasas progenitoras (es decir enzimas clasificadas según el número de Clasificación Enzimática E.C. 3.4 conforme a las recomendaciones (1992) de la Unión Internacional de Bioquímica y biología molecular (IUBBM) incluyen a las proteasas dentro de este grupo.

Algunos ejemplos son las proteasas seleccionadas de aquellas clasificadas bajo los números de Clasificación Enzimática (E.C.):

3.4.11 (es decir las denominadas aminopeptidasas), incluyendo 3.4.11.5 (Prolil aminopeptidasa); 3.4.11.9 (X-pro aminopeptidasa); 3.4.11.10 (Leucil aminopeptidasa bacteriana); 3.4.11.12 (Aminopeptidasa termofílica); 3.4.11.15 (Lisil aminopeptidasa); 3.4.11.17 (Tryptofanil aminopeptidasa); 3.4.11.18 (Metionil aminopeptidasa).

3.4.21 (es decir las denominadas serina-endopeptidasas), incluyendo 3.4.21.1 (Quimiotripsina); 3.4.21.4 (Tripsina); 3.4.21.19 (Glutamil-endopeptidasa Glu-C, V8 de *Staphylococcus aureus*); 3.4.21.25 (Cucumisina); 3.4.21.32 (Braquiurina); 3.4.21.48 (Cerevisina) y 3.4.21.62 (Subtilisina);

3.4.22 (es decir las denominadas cisteína endopeptidasas), incluyendo 3.4.22.2 (Papaína); 3.4.22.3 (Ficaina); 3.4.22.6 (Quimopapaína); 3.4.22.7 (Asclepaina); 3.4.22.14 (Actinidaina); 3.4.22.30 (Caricaína) y 3.4.22.31 (Ananaína);

3.4.23 (es decir las denominadas endopeptidasas aspárticas), incluyendo 3.4.23.1 (Pepsina A); 3.4.23.18 (Aspergillopepsina I); 3.4.23.20 (Penicillopepsina) y 3.4.23.25 (Sacaropepsina); y

3.4.24 (es decir las denominadas metaloendopeptidasas), incluyendo 3.4.24.28 (Bacilolisina).

Ejemplos de las subtilisinas relevantes comprenden la subtilisina BPN', subtilisina amilosacarítica, subtilisina 168, subtilisina mesentericopeptidasa, subtilisina Carlsberg, subtilisina DY, subtilisina 309, subtilisina 147, termitasa, aqualisina, proteasa de bacillus PB92, proteinasa K, proteasa TW7, y proteasa TW3.

ES 2 289 824 T3

Ejemplos específicos de tales proteasas comerciales fácilmente disponibles incluyen Esperase®, Alcalase®, Neutrase®, Dyrazym®, Savinase®, Pyrase®, tripsina pancreática NOVO (PTN), Bio-Feed™ Pro, Clear-Lens Pro (todas las enzimas disponibles por Novo Nordisk A/S).

- 5 Ejemplos de otras proteasas comerciales incluyen Maxtase®, Maxacal®, Maxapem® comercializadas por Gist-Brocades N.V., Opticlean® comercializada por Solvay et Cie. y Purafect® comercializada por Genencor Internacional.

10 Debe entenderse que también las variantes de la proteasa están contempladas como la proteasa progenitora. Ejemplos de tales variantes de la proteasa están descritas en EP 130756 (Genentech), EP214435 (Henkel), WO 87/04461 (Amgen), WO 87/05050 (Genex), EP 251446 (Genencor), EP 260105 (Genencor), Thomas *et al.* (1985) Nature. 318, págs. 375-376, Thomas *et al.*, (1987), J. Mol. Biol., 193, págs. 803-813, Tussel *et al.*, (1987) Nature 328, págs. 496-500, WO 88/08028 (Genex), WO 88/08033 (Amgen), WO 89/06279 (Novo Nordisk A/S), WO 91/00345 (Novo Nordisk A/S), EP 525 610 (Solvay) y WO 94/02618 (Gist-Brocades N.V.).

15 La actividad de las proteasas puede ser determinada como se describe en "Methods of Enzymatic Analysis", tercera edición, 1984, Verlag Chemie, Weinheim, vol. 5.

20 *Lipasas progenitoras*

Las lipasas progenitoras (es decir las enzimas clasificadas bajo el número de Clasificación Enzimática E.C. 3.1.1 (hidrolasas de éster carboxílico) conforme a las recomendaciones (1992) de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBBM) incluyen a las lipasas dentro de este grupo.

- 25 Algunos ejemplos son las lipasas seleccionadas de aquellas clasificadas bajo los números de Clasificación enzimática (E.C):

3.1.1 (es decir las denominadas hidrolasas de éster carboxílico), incluyendo (3.1.1.3) triacilglicerol lipasas, (3.1.1.4.) Fosfolipasa A2.

30 Ejemplos de lipasas son las lipasas derivadas de los microorganismos siguientes. Las publicaciones de patente indicadas están incorporadas aquí por referencia:

Humicola, p. ej. *H. brevispora*, *H. lanuginosa*, *H. brevis var. thermoidea* y *H. insolens* (US 4810414)

35 Pseudomonas, p. ej. *Ps. fragi*, *Ps. stutzeri*, *Ps. cepacia* y *Ps. fluorescens* (WO 89/04361), o *Ps. plantari* o *Ps. gladioli* (patente US nº 4950417 (Solvay enzymes)) o *Ps. alacaligenes* y *Ps. pseudoalcaligenes* (EP 218 272) o *Ps. mendocina* (WO 88/09367; US 5389536)

40 Fusarium, p. ej. *F. oxysporum* (EP 130064) o *F. solani pisi* (WO 90/09446). Mucor (también llamada Rhizomucor), p.ej. *M. mihei* (EP 238023).

Chromobacterium (especialmente *C. viscosum*), Aspergillus (especialmente *A. Niger*).

45 Candida, p. ej. *C. cylindracea* (también llamada *C. rugosa*) o *C. antarctica* (WO 88/02775) o *C. antarctica* lipasa A o B (WO 94/01541 y WO 89/02916).

Geotricum, p.ej. *G. candidum* (Schimada *et al.*, (1989), J. Biochem., 106, 383-388).

50 Penicillium, p. ej. *P. camembertii* (Yamaguchi *et al.*, (1991) Gene 103, 61-67).

Rhizopus, p. ej. *R. delemar* (Hass *et al.*, (1991), Gene 109, 107-113) o *R. niveus* (Kugimiya *et al.*, (1992) Biosci. Biotech. Biochem 56, 716-719) o *R. oryzae*.

55 Bacillus, p. ej. *B. subtilis* (Dartois *et al.*, (1993) Biochemica et Biophysica acta 1131, 53-260) o *B. stearothermophilus* (JP 64/7744992) o *B. pumilus* (WO 91/16422).

60 Ejemplos específicos de lipasas comerciales fácilmente disponibles incluyen Lipolase®, Lipolase™ Ultra, Lipozyme®, Palatase®, Novozym® 435, Lecitase® (todos disponibles por Novo Nordisk A/S).

Ejemplos de otras lipasas son Lumafast™, lipasa de *Ps. mendocian* de Genencor Int. Inc.; Lipomax™, lipasa de *Ps. pseudoalcaligenes* de Gist Brocades/Genencor Int. Inc.; lipasa de *Fusarium solani* (cutinasa) de Unilever; lipasa de *Bacillus sp.* de Solvay enzymes. Otras lipasas están disponibles por otras compañías.

65 Debe entenderse que las variantes de la lipasa también están contempladas como la enzima progenitora. Ejemplos de ello están descritos en p. ej. WO 93/01285 y WO 95/22615.

La actividad de la lipasa puede ser determinada como se describe en “Methods of Enzymatic Analysis”, Tercera Edición, 1984, Verlag Chemie, Weinheim, vol. 4, o como se describe en AF 95/5 GB (disponible bajo pedido por Novo Nordisk A/S).

5 Oxidorreductasas progenitoras

Las oxidorreductasas progenitoras (es decir enzimas clasificadas según el Número de clasificación enzimática E.C. 1 (oxidorreductasas) conforme a las recomendaciones (1992) de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBBM) incluyen a las oxidorreductasas dentro de este grupo.

10

Ejemplos son oxidorreductasas seleccionadas de aquellas clasificadas bajo los números de Clasificación Enzimática (E.C):

15 Glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa NAD^+ (1.1.1.8), glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa NAD(P)^+ (1.1.1.94), Glicerol-3-fosfato 1-deshidrogenasa NADP^+ (1.1.1.94), glucosa-oxidasa (1.1.3.4), hexosa oxidasa (1.1.3.5), Catecol oxidasa (1.1.3.14), Bilirrubina oxidasa (1.3.3.5), alanina-deshidrogenasa (1.4.1.1), glutamato-deshidrogenasa (1.4.1.2), glutamato-deshidrogenasa NAD(P)^+ (1.4.1.3), deshidrogenasa glutamato NADP^+ (1.4.1.4), L-aminoácido deshidrogenasa (1.4.1.5), serina deshidrogenasa (1.4.1.7), valina deshidrogenasa NADP^+ (1.4.1.8), leucina deshidrogenasa (1.4.1.9), glicina-deshidrogenasa (1.4.1.10), L-aminoácido oxidasa (1.4.3.2), D-amino-ácido oxidasa (1.9.3.3), L-glutamato oxidasa (1.4.3.11), proteína-lisina 6-oxidasa (1.4.3.13), L-lisina-oxidasa (1.4.3.14), L-aspartato oxidasa (1.4.3.16), D-aminoácido deshidrogenasa (1.4.99.1), Proteína disulfuro reductasa (1.6.4.4), Tiorredoxina reductasa (1.6.4.5), proteína disulfuro reductasa (glutathione) (1.8.4.2), lacasa (1.10.3.2), catalasa (1.11.1.6), peroxidasa (1.11.1.7), lipoxigenasa (1.13.11.12), superóxido-dismutasa (1.15.1.1).

25 Dichas glucosa oxidasas pueden derivar de *Aspergillus Niger*.

Dichas lacasas pueden derivar de *Polyporus pinsitus*, *Myceliophthora thermophila*, *Coprinus cinereus*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizoctonia praticola*, *Scytalidium thermophilum* y *Rhus vernicifera*.

30 Las bilirrubina oxidasas pueden derivar de *Myrothecheium verrucaria*.

La peroxidasa puede derivar de p. ej. soja, alfalfa o *Coprinus cinereus*.

35 La Proteína disulfuro reductasa puede ser cualquiera mencionada en cualquiera de las solicitudes de patente danesas N° 768/93, 265/94 y 264/94 (Novo Nordisk A/S), las cuales están incorporadas en la presente como referencia, incluyendo las Proteínas disulfuro reductasas de origen bovino, las Proteínas disulfuro reductasas derivadas de *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus Niger*, y DsbA o DsbC derivadas de *Escherichia coli*.

40 Ejemplos específicos de oxidorreductasas comerciales fácilmente disponibles incluyen Gluzyme™ (enzima disponible por Novo Nordisk A/S). No obstante, otras oxidorreductasas están disponibles por otros.

Debe entenderse que las variantes de oxidorreductasas también están contempladas como la enzima progenitora.

45 La actividad de las oxidorreductasas puede ser determinada como se describe en “Methods of Enzymatic Analysis”, tercera edición, 1984, Verlag Chemie, Weinheim, vol.3.

Carbohidrasas progenitoras

50 Las carbohidrasas progenitoras pueden ser definidas como todas las enzimas capaces de hidrolizar las cadenas de carbohidratos (p. ej. almidones) particularmente de estructuras de anillos de cinco y seis miembros (es decir las enzimas clasificadas bajo el número de Clasificación Enzimática E.C. 3.2 (glicosidasas) conforme a las recomendaciones (1992) de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBBM)). También incluidas en el grupo de las carbohidrasas según la invención están las enzimas capaces de isomerizar carbohidratos p. ej. estructuras de anillos de seis miembros, tales como la D-glucosa hasta p. ej. estructuras de anillos de cinco miembros como la D-fructosa.

55

Ejemplos son las carbohidrasas seleccionadas de aquellas clasificadas bajo los números de Clasificación Enzimática (E.C):

60 α -amilasa (3.2.1.1) β -amilasa (3.2.1.2), glucano 1,4- α -glucosidasa (3.2.1.3), celulasa (3.2.1.4), endo-1,3(4)- β -glucanasa (3.2.1.6), endo-1,4- β -xilanasasa (3.2.1.8), dextranasa (3.2.1.11), quitinasa (3.2.1.14), poligalacturonasa (3.2.1.15), lisozima (3.2.1.17), β -glucosidasa (3.2.1.21), α -galactosidasa (3.2.1.22), β -galactosidasa (3.2.1.23), amilo-1,6-glucosidasa (3.2.1.33), xilano 1,4- β -xilosidasa (3.2.1.37), glucano endo-1,3- β -D-glucosidasa (3.2.1.39), α -dextrina endo-1,6-glucosidasa (3.2.1.41), sacarosa α -glucosidasa (3.2.1.48), glucano endo-1,3- α -glucosidasa (3.2.1.59), glucano 1,4- β -glucosidasa (3.2.1.74), glucano endo-1,6- β -glucosidasa (3.2.1.75), arabinano endo-1,5- α -arabinosidasa (3.2.1.99), lactasa (3.2.1.108), quitananasa (3.2.1.132) y xilosa isomerasa (5.3.1.5).

65

Ejemplos de carbohidrasas relevantes incluyen α -1,3-glucanasas derivadas de *Trichoderma harzianum*; α -1,6-glucanasas derivadas de una cepa de *Paecilomyces*; β -glucanasas derivadas de *Bacillus subtilis*; β -glucanasas derivadas de

Humicola insolens; β -glucanasas derivadas de *Aspergillus Niger*; β -glucanasas derivadas de una cepa de *Trichoderma*; β -glucanasas derivadas de una cepa de *Oerskovia xantineolytica*; exo-1,4- α -D-glucosidasas (glucoamilasas) derivadas de *Aspergillus Niger*; α -amilasas derivadas de *Bacillus subtilis*; α -amilasas derivadas de *Bacillus amiloliquefaciens*; α -amilasas derivadas de *Bacillus stearothermophilus*; α -amilasas derivadas de *Aspergillus oryzae*; α -amilasas derivadas de microorganismos no patógenos; α -galactosidasas derivadas de *Aspergillus Niger*; pentosanasas, xilanasas, celobiasas, celulasas, hemicelulasas derivadas de *Humicola insolens*; celulasas derivadas de *Trichoderma reesei*; celulasas derivadas de molde no patógeno; pectinasas, celulasas, arabinasas, hemicelulosas derivadas de *Aspergillus Niger*; dextranasas derivadas de *Penicillium lilacinum*; endoglucanasa derivada de molde no patógeno; pululanasa derivadas de *Bacillus acidopulliticus*; (3-galactosidasas derivadas de *Kluyveromices fragilis*; xilanasas derivadas de *Trichoderma reesei*;

Ejemplos específicos de carbohidrasas comerciales fácilmente disponibles incluyen Alpha-GalTM, Bio-FeedTM Alpha, Bio-FeedTM Beta, Bio-FeedTM Plus, Bio-FeedTM Plus, Novozyme[®] 188, Carezyme[®], Celluclast[®], Cellusoft[®], Ceremyl[®], CitrozymTM, DenimaxTM, DezymeTM, DextrozymeTM Finizym[®], FungamylTM, GamanaseTM, Glucanex[®], Lactozym[®], MaltogenaseTM PentopanTM, PectinexTM, Promozyne[®], PulpzymeTM, NovamylTM, Termamyl[®], AMG (Amyloglucosidase Novo), Maltogenase[®], Sweetzyme[®], Aquazym[®], Natalase[®] (todas las enzimas disponibles por novo Nordisk A/S). Otras carbohidrasas están disponibles por otras compañías.

Las variantes de carbohidrasa pueden funcionar como la enzima progenitora.

La actividad de carbohidrasas pueden ser determinadas como se describe en "Methods of Enzymatic Analysis", tercera edición, 1984, Verlag Chemie, Weinheim, vol. 4.

Transferasas progenitoras

Las transferasas progenitoras (es decir las enzimas clasificadas bajo el número de Clasificación Enzimática E.C. 2 conforme a las recomendaciones (1992) de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBBM) incluyen a las transferasas dentro de este grupo.

Las transferasas progenitoras pueden ser cualquier transferasa en los subgrupos de las transferasas: las transferasas que transfieren un grupo de carbono (E.C. 2.1); las transferasas que transfieren aldehídos o residuos (E.C. 2.2); las aciltransferasas (E.C. 2.3); las glucosiltransferasas (E.C. 2.4); las transferasas que transfieren grupos alquilo o arilo, otros grupos aparte de los grupos metilo (E.C. 2.5); las transferasas que transfieren grupos nitrogenosos (2.6). En una forma de realización preferida la transferasa progenitora es una transglutaminasa E.C. 2.3.2.13 (Proteína-glutamina μ -glutamyltransferasa).

Las transglutaminasas son enzimas capaces de catalizar una reacción de transferencia de acilo en la que un grupo gamma-carboxiamida de un residuo de glutamina unido con péptidos es el donador de acilo. Los grupos amino primarios en una variedad de compuestos pueden funcionar como aceptadores de acilo con la formación posterior de gamma-amidas monosustituidas de ácido glutámico unido con péptidos. Cuando el grupo epsilon-amino de un residuo de lisina en una cadena peptídica sirve como el aceptor de acilo, las transferasas forman reticulaciones intramoleculares o gamma-glutamyl-epsilon-lisilo intermoleculares.

Ejemplos de transglutaminasas están descritos en la solicitud de patente danesa pendiente No. 990/94 (Novo Nordisk A/S).

La transglutaminasa progenitora puede ser de origen humano, animal (p. ej. bovino) o microbiano.

Ejemplos de tales transglutaminasas progenitoras son la transglutaminasa de animal, FXIIIa; las transglutaminasas microbianas de *Physarum polycephalum* (Klein *et al.*, Journal of Bacteriology, Vol. 174, págs. 2599-2605); las transglutaminasas derivadas de *Streptomyces sp.*, incluyendo *Streptomyces lavendulae*, *Streptomyces lydicus* (anterior *Streptomyces libani*) y *Streptoverticillium sp.*, incluyendo *Streptoverticillium mobaraense*, *Streptoverticillium cinnamomeum*, y *Streptoverticillium griseocarneum* (Motoki *et al.*, US 5156956; Andou *et al.*, UD 5252469, Kaempfer *et al.*, Journal of General Microbiology, Vol. 137, págs. 1831-1892; Ochi *et al.*, International Journal of Systematic Bacteriology, Vol. 44, págs. 285-292; Andou *et al.*, US 5252469; Williams *et al.*, Journal of General Microbiology, Vol. 129, págs. 1743-1813).

La enzima progenitora puede también ser una variante de la transferasa.

La actividad de las transglutaminasas puede ser determinada como se describe en "Methods of Enzymatic Analysis", tercera edición, 1984, Verlag Chemie, Weinheim, vol. 1-10.

Fitasas progenitoras

Las fitasas progenitoras están incluidas en el grupo de enzimas clasificado bajo el número de Clasificación Enzimática E.C. 3.1.3 (hidrolasas de monoéster fosfórico) conforme a las recomendaciones (1992) de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBBM)).

Las fitasas son enzimas producidas por microorganismos que catalizan la conversión del fitato en inositol y microorganismos que producen fitasa fosforosa inorgánica comprenden bacterias tales como *Bacillus subtilis*, *Bacillus natto* y *Pseudomonas*; levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*; y hongos tales como *Aspergillus Niger*, *Aspergillus ficuum*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus* o *Aspergillus nidulans*, y varias otras especies de *Aspergillus*).

Ejemplos de fitasas progenitoras incluyen las fitasas seleccionadas de aquellas clasificadas según los números de Clasificación Enzimática (E.C.): 3- fitasa (3.1.3.8) y 6-fitasa (3.1.3.26).

La actividad de las fitasas puede ser determinada como se describe en "Methods of Enzymatic Analysis", tercera edición, 1984, Verlag Chemie, Weinheim, vol. 1-10, o puede ser medida según el método descrito en EP-A1-0 420 358, Ejemplo 2 A.

Una composición puede comprender al menos una proteína (polipéptido) o enzima producida por el método de la invención. La composición puede comprender otros polipéptidos, proteínas o enzimas y/o ingredientes normalmente usados en productos para el cuidado personal tales como champú, pastillas de jabón, loción para la piel, crema para la piel, tinte para el cabello, pasta dental, artículos de hogar, productos agroquímicos, productos de cuidado personal, tales como preparaciones de limpieza p. ej. para lentes de contacto, cosméticos, sanitarios, fármacos orales y dérmicos, composiciones usadas para tratar textiles, composiciones usadas para la fabricación de alimentos, p. ej. cocción, y piensos etc.

Ejemplos de dichas proteínas(polipéptidos)/enzimas incluyen enzimas que presentan actividad polipeptídica de proteasa, lipasa, oxidoreductasa, carbohidrasa, transferasa, tales como transglutaminasa, fitasa y/o antimicrobiana. Estas enzimas pueden estar presentes como conjugados con actividad reducida.

La proteína producida según el método de la invención puede además normalmente ser usada en una composición de detergente. Puede ser incluida en la composición de detergente en forma de un granulado no pulverulento, un líquido estabilizado, o una enzima protegida. Los granulados no pulverulentos pueden ser producidos, p. ej., como se describe en US 4106991 y 4661452 (ambos de Novo Industri A/S) y pueden opcionalmente ser revestidos por métodos conocidos en la técnica. Ejemplos de materiales de revestimiento cerosos son productos de óxido de polietileno (polietilenglicol, PEG) con pesos moleculares medios de 1000 a 20000; nonilfenoles etoxilados con 16 a 50 unidades de óxido de etileno; alcoholes etoxilados grasos donde el alcohol contiene de 12 a 20 átomos de carbono y en los cuales hay 15 a 80 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos; ácidos grasos; y mono-, di- y triglicéridos de ácidos grasos. Ejemplos de materiales de revestimiento formadores de películas adecuados para la aplicación mediante técnicas de lecho fluidificado están proporcionados en la patente 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 los métodos establecidos. Otros estabilizadores enzimáticos son bien conocidos en la técnica. Enzimas protegidas pueden ser preparadas según el método descrito en EP 223216.

La composición de detergente puede estar en cualquier forma conveniente, p. ej. polvo, gránulos, pasta o líquido. Un detergente líquido puede ser acuoso, normalmente conteniendo hasta un 70% de agua y un 0-30% de solvente orgánico, o no acuoso.

La composición de detergente comprende uno o más agentes tensioactivos, cada uno de los cuales puede ser aniónico, no fónico catiónico, o zwitteriónico. El detergente normalmente contiene un 0-50% de agente tensioactivo aniónico tal como alquilobencenosulfonato lineal (LAS), alfa-olefinsulfonato (AOS), alquil sulfato (sulfato de alcohol graso) (AS), etoxisulfato de alcohol (AEOS o AES), alcanosulfonatos secundarios (SAS), alfa-sulfo ésteres metílicos de ácidos grasos, ácido alquil- o alquenilsuccínico, o jabón. Puede también contener un 0-40% de agente tensioactivo no iónico tal como etoxilato de alcohol (AEO o AE), etoxilatos de alcohol carboxilado, etoxilato de nonilfenol, alquilpoliglicósido, óxido de alquildimetilamina, monoetanolamida de ácidos grasos etoxilados, monoetanolamida de ácidos grasos, o polihidroxi alquil amida de ácidos grasos (p. ej. como se describe en WO 92/06154).

La composición de detergente puede adicionalmente comprender una o varias enzimas, tales como p. ej. proteasas, amilasas, lipasas, cutinasas, celulasas, peroxidasas, oxidasas, y polipéptidos adicionales antimicrobianos.

El detergente puede contener un 1-65% de un constructor de detergente o agente complejante tal como zeolita, difosfato, trifosfato, fosfonato, citrato, ácido nitrilotriacético (NTA), ácido etilenodiaminatetraacético (EDTA), ácido dietileno-triaminopentaacético (DTMPA), ácido alquil- o alquenilsuccínico, silicatos solubles o silicatos estratificados (p. ej. SKS- 6 de Hoechst). El detergente puede también estar sin construir, es decir esencialmente libre de constructor de detergente.

El detergente puede comprender uno o más polímeros. Ejemplos son carboximetilcelulosa (CMC), polivinilpirrolidona (PVP), polietilenglicol (PEG), alcohol de polivinilo (alcohol polivinílico), policarboxilatos tales como poliacrilatos, copolímeros de ácido maléico/acrílico y copolímeros de lauril metacrilato/ácido acrílico.

El detergente puede contener un sistema blanqueador que puede comprender una fuente de H₂O₂ tal como perborato o percarbonato que puede ser combinada con un activador decolorante formador de perácido tal como tetraaceti-

letilenodiamina (TAED) o nonanoiloxibencenosulfonato (NOBS). De forma alternativa, el sistema blanqueador puede comprender peroxiácidos de, p. ej., el tipo amida, imida, o sulfona.

La composición de detergente que comprende un polipéptido producido según la invención puede ser estabilizado usando agentes convencionales estabilizantes, p. ej. un poliol tal como propilenoglicol o glicerol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico, ácido bórico, o un derivado de ácido bórico tal como, p. ej., un éster de borato aromático, y la composición puede ser formulada como se describe en, p. ej., WO 92/19709 y WO 92/19708.

El detergente puede también contener otros ingredientes de detergentes convencionales tales como, p. ej., acondicionadores de tejidos incluyendo arcillas, aceleradores de la espuma, supresores de la espuma, agentes anticorrosivos, agentes de suspensión de suciedad, agentes antirreposición de la suciedad, tintes, bactericidas, blanqueadores ópticos, o perfume. El pH (medido en solución acuosa a la concentración de uso) normalmente será neutro o alcalino, p. ej. en la gama de 7-11.

15 *Composición de lavavajillas*

Además, una enzima modificada producida según la invención puede también ser usada en detergentes lavavajillas.

Las composiciones de detergentes lavavajillas comprenden un agente tensioactivo que puede ser aniónico, no iónico, catiónico, anfotérico o una mezcla de estos tipos. El detergente contendrá un 0-90% de agente tensioactivo no iónico tal como alcoholes de cadena recta propoxilados etoxilados poco o no espumantes.

La composición de detergente puede contener sales constructoras de detergente de tipo inorgánico y/u orgánico. Los constructores de detergentes pueden ser subdivididos en tipos con fósforo y sin fósforo. La composición de detergente normalmente contiene un 1-90% de constructores de detergentes.

Ejemplos de constructores de detergentes alcalinos inorgánicos con fósforo, cuando están presentes, incluyen las sales hidrosolubles especialmente pirofosfatos, ortofosfatos, y polifosfatos de metal alcalino. Un ejemplo de constructor de detergente orgánico alcalino con fósforo, cuando está presente, incluye las sales hidrosolubles de fosfonatos.

Ejemplos de constructores inorgánicos sin fósforo, cuando están presentes, incluyen carbonatos de metal alcalino hidrosoluble, boratos y silicatos al igual que los varios tipos de silicatos de aluminio cristalinos o amorfos hidrosolubles de los cuales las zeolitas son los representantes más conocidos.

Ejemplos de constructores adecuados orgánicos incluyen el metal alcalino, amonio y amonio sustituido, citratos, succinatos, malonaos, sulfonatos de ácidos grasos, carboximetoxi succinatos, poliacetatos de amonio, carboxilatos, policarboxilatos, aminopolicarboxilatos, poliactil carboxilatos y polihidroxulfonatos.

Otros constructores adecuados orgánicos incluyen los polímeros y copolímeros con el peso molecular más alto conocidos por tener propiedades de constructores, por ejemplo los ácidos apropiados como ácido poliacrílico, y ácido polimaleico y copolímeros de ácido poliacrílico/polimaleico, y sus sales.

La composición de detergente de lavavajillas puede contener agentes blanqueadores del tipo clorina/bromina o del tipo oxígeno. Ejemplos de blanqueadores inorgánicos de tipo clorina/bromina son el hipoclorito e hipobromito de litio, sodio o calcio así como el fosfato trisódico clorurado. Ejemplos de blanqueadores orgánicos de tipo clorina/bromina son N-bromo y N-cloro imidas heterocíclicas tales como ácidos tricloroisocianuricos, tribromoisocianuricos, dibromoisocianuricos y dicloroisocianuricos, y sales derivadas con cationes hidrosolubilizadores tales como potasio y sodio. Los compuestos de hidantoína son también adecuados.

Los blanqueadores de oxígeno son preferidos, por ejemplo en forma de una persal inorgánica, preferiblemente con un precursor del blanqueamiento o como un compuesto de peroxiácido. Ejemplos típicos de compuestos blanqueadores de peroxi adecuados son perboratos de metal alcalino, tanto tetrahidratos como monohidratos, percarbonatos de metal alcalino, persilicatos y perfosfatos. Los materiales activadores preferidos son TAED y triacetato de glicerol.

La composición de detergente de lavavajillas puede ser estabilizada usando agentes estabilizantes convencionales para la(s) enzima(s), p. ej. un poliol tal como p. ej. propilenoglicol, un azúcar o un alcohol de azúcar, ácido láctico, ácido bórico; o un derivado de ácido bórico, p. ej. un éster de borato aromático.

La composición de detergente de lavavajillas puede también contener otros ingredientes de detergentes convencionales, p. ej. material desfloculante, material de relleno, depresores de espuma, agentes anticorrosivos, agentes de suspensión de suciedad, agentes secuestrantes, agentes antirreposición de la suciedad, agentes deshidratantes, tintes, bactericidas, fluorescentes, espesantes y perfumes.

Finalmente, la enzima producida según la invención puede ser usada en detergentes de lavavajillas convencionales, p. ej. en cualquiera de los detergentes descritos en cualquiera de las publicaciones de patente siguientes: EP518719, EP 518720, EP 518721, EP516553, EP 516554, EP 516555, GB 2200132, DE 3741617, DE 3727911, DE 4212166, DE 4137470, DE 3833047, WO 93/17089, DE 4205071, WO 52/09680, WO 93/18129, WO 93/09153, WO 92/06157, WO

92/08777, EP 429124, WO 93/21299, US 5141664, EP 561452, EP 561446, GB 2234980, WO 93/03129, EP 481547, EP 530870, EP 533239, EP 554943, EP 346137, US 5112518, EP 318204, EP 318279, EP 271155, EP 271156, EP 346136, GB 2228945, CA 2006687, WO 93/25651, EP 530635, EP 414197, US 5240632.

5 *Aplicaciones para el cuidado personal*

La proteína producida según la invención es también interesante con respecto a las aplicaciones para el cuidado personal.

10 *Proteasas*

Las proteasas son ingredientes activos bien conocidos para la limpieza de las lentes de contacto. Éstas hidrolizan la suciedad proteínica en las lentes y haciéndola soluble. La eliminación de la suciedad proteínica es esencial para la confortabilidad a la hora de llevarlas puestas.

15

Las proteasas son ingredientes también eficaces en productos de limpieza de la piel, donde eliminan la capa superior de las células muertas de la piel queratinosa y de ese modo hacen que la piel parezca más luminosa y más fresca.

20

Las proteasas son también usadas en productos para el cuidado bucal, especialmente para la limpieza de dentaduras, pero también en dentífricos.

Además, las proteasas pueden ser usadas en productos para el aseo, baño y ducha, incluyendo champús, acondicionadores, lociones, cremas, pastillas de jabón, jabones de aseo, y jabones líquidos.

25

Lipasas

Las lipasas pueden ser aplicadas al uso cosmético como ingredientes activos en productos para la limpieza de la piel y productos antiacné para la eliminación del exceso de lípidos de la piel, y en productos para el baño y la ducha tales como cremas y lociones como ingredientes activos para el cuidado de la piel.

30

Las lipasas pueden también ser usadas en productos para la limpieza del cabello (p. ej. champús) para la eliminación eficaz del sebo y otro material graso de la superficie del cabello.

35

Las lipasas también son ingredientes eficaces en productos para la limpieza de las lentes de contacto, donde eliminan los depósitos lipídicos de la superficie de la lente.

Oxidorreductasas

40

La oxidorreductasa más común para el cuidado personal es una oxidasa (normalmente glucosa-oxidasa) con sustrato (p. ej. glucosa) que asegura la producción de H_2O_2 , que luego iniciará la oxidación de por ejemplo SCN- o I- en reactivos antimicrobianos (SCNO- o I_2) por una peroxidasa (normalmente lactoperoxidasa). En la naturaleza, el complejo enzimático conocido procede de p. ej. la leche y de la saliva.

45

Está siendo utilizado comercialmente como sistema antimicrobiano en productos de cuidado bucal (enjuague bucal, dentífrico, goma de mascar) donde también puede ser combinado con una amiloglucosidasa para producir la glucosa. Estos sistemas son también conocidos en productos cosméticos para la conservación.

50

Los sistemas antimicrobianos que comprenden la combinación de una oxidasa y una peroxidasa son conocidos en la limpieza de las lentes de contacto.

Otra aplicación de las oxidorreductasas es el tinte para el cabello oxidante que utiliza oxidasas, peroxidasas y lacasas.

55

Los radicales libres formados en la superficie de la piel (y el cabello) son conocidos por estar asociados con el proceso del envejecimiento de la piel. Los radicales libres activan las reacciones en cadena conduciendo a la destrucción de las membranas grasas, el colágeno, y las células. La aplicación de eliminadores de radicales libres tales como la superóxido dismutasa en cosméticos es bien conocida (R.L. Goldemberg, DCI, Nov. 93, págs. 48-52).

60

La Proteína Disulfuro Isomerasa (PDI) es también una oxidorreductasa. Esta puede ser utilizada para ondular el cabello (reducción y reoxidación de enlaces disulfuro en el cabello) y para reparar el cabello estropeado (donde el daño es principalmente la reducción de los enlaces disulfuro existentes).

Carbohidrasas

65

La placa formada en la superficie de los dientes está compuesta principalmente por polisacáridos. Estos se pegan a la superficie de los dientes y de los microorganismos. Los polisacáridos son principalmente glucosa enlazada en α -1,6 (dextrano) y glucosa enlazada en α -1,3 (mutano). La aplicación de diferentes tipos de glucanasas tales como la

ES 2 289 824 T3

mutanasa y la dextranasa ayuda a hidrolizar la matriz pegajosa de la placa, haciendo que sea más fácil de eliminar por la acción mecánica.

Además otros tipos de biopelículas por ejemplo la biopelícula formada en las fundas para las lentes puede ser eliminada por la acción de las glucanasas.

Alimentos y Piensos

Otras enzimas o polipéptidos conjugados con alergenicidad reducida producidos según la invención pueden ventajosamente ser usados para la producción de alimentos y piensos.

Proteasas

El gluten en la harina de trigo es el ingrediente esencial responsable de la capacidad de la harina para ser usada en productos alimenticios cocidos al horno. Las enzimas proteolíticas son a veces necesarias para modificar la fase del gluten de la masa, p. ej. una harina de trigo dura puede ser ablandada con una proteasa.

Neutrase® es una metaloproteasa neutra comercialmente disponible que puede utilizarse para asegurar una calidad de la masa y textura del pan uniformes, y para mejorar el sabor. Las proteínas del gluten son degradadas sea de forma moderada o de forma más abundante en péptidos, con lo cual es necesario un control cercano para evitar el reblandecimiento en exceso de la masa.

Las proteasas son también usadas para modificar las proteínas lácteas. Para coagular la caseína en leche al fabricar queso se pueden usar proteínas tales como cuajo o quimosina.

En la industria cervecera, las proteasas se utilizan para la fabricación de la cerveza con cereales sin malta y para controlar el contenido en nitrógeno. En los productos de piensos, las proteasas se utilizan digamos para extender el sistema de digestión en los animales.

Lipasas

La aplicación de la lipasa en la industria de la cocción al horno es más bien nueva. La adición de la lipasa resulta en propiedades de masa mejorada y una calidad en la fabricación del pan mejorada en cuanto a mayor volumen, estructura de la miga mejorada y miga de color más blanco. El efecto observado puede ser explicado por un mecanismo en el que la lipasa cambia la interacción entre el gluten y algún fragmento lipídico durante la mezcla de la masa. Esto resulta en una red de gluten mejorada.

El desarrollo del sabor de los quesos de roano azul (p. ej. Danablu), ciertos quesos de tipo italiano y otros productos lácteos que contienen manteca depende de la degradación de la grasa láctea en ácidos grasos libres. Las lipasas pueden ser usadas para desarrollar el sabor en estos productos.

En la industria de la producción de aceites y grasas, las lipasas son usadas p. ej. para minimizar la cantidad de productos secundarios indeseables, para modificar grasas por interesterificación, y para la síntesis de ésteres.

Oxidoreductasas

Además, las oxidoreductasas con alergenicidad reducida producidas según la invención pueden ser usadas ventajosamente en la producción de alimentos y piensos.

Diferentes oxidoreductasas son usadas para la cocción al horno, como la glucosa oxidasa, lipoxigenasa, peroxidasa, catalasa y combinaciones de éstas. Generalmente, los panaderos refuerzan el gluten añadiendo ácido ascórbico y bromato de potasio. Algunas oxidoreductasas pueden utilizarse para reemplazar bromato en los sistemas de la masa por la oxidación de unidades libres de sulfidrilo en las proteínas del gluten. De esta manera, se forman enlaces de disulfuro dando como resultado, masas más grandes, más elásticas y con mayor resistencia.

Gluzyme™ (Novo Nordisk A/S) es una preparación de glucosa-oxidasa con actividad catalasa que puede utilizarse para reemplazar al bromato. El reforzamiento de la masa se mide como mayor resistencia a un impacto mecánico, mejor elasticidad de la masa en el horno y más volumen de la rebanada.

Carbohidrasas

La harina tiene un contenido variable de amilasas conduciendo a diferencias en la calidad de la cocción al horno. La adición de amilasas puede ser necesaria para estandarizar la harina. Las amilasas y las pentosanasas generalmente proporcionan azúcar para la fermentación de la levadura, mejoran el volumen del pan, retrasan la retrogradación, y reducen el nivel de formación de gusto a rancio y la pegajosidad que resulta de las gomas de pentosano. Ejemplos de carbohidrasas están provistos abajo.

Ciertas amilasas maltogénicas pueden ser usadas para prolongar el tiempo de conservación del pan durante dos o más días sin provocar gomosidad en el producto. El mecanismo detrás de ello es que las amilasas modifiquen selectivamente el almidón gelatinizado por el seccionamiento del extremo no reductor de las moléculas de almidón, de azúcares de peso molecular bajo y de dextrinas. El almidón es modificado de manera que sea menos probable que ocurra la retrogradación. Los azúcares de bajo peso molecular producidos mejoran la capacidad de retención del agua de los productos cocidos al horno sin producir dextrinas de longitud intermedia que resultan en una gomosidad en el producto acabado. La enzima es inactivada durante la cocción del pan, por lo tanto puede ser considerada un ayudante para el procesamiento que no tiene que ser declarada en la etiqueta. Una sobredosis de Novamyl puede prácticamente ser excluida.

El volumen del pan puede ser mejorado por α -amilasas fúngicas las cuales además proporcionan una estructura buena y uniforme de la miga del pan. Dichas α -amilasas son endoenzimas que producen maltosa, dextrinas y glucosa. Las α -amilasas de cereales y algunas bacterianas son inactivadas a temperaturas por encima de la temperatura de gelatinización del almidón, en consecuencia cuando se añaden a la masa de trigo se consigue un volumen de pan bajo y un interior del pan pegajoso. El fungamyl tiene la ventaja de ser termolábil y se inactiva justo por debajo de la temperatura de gelatinización.

Las preparaciones enzimáticas que contienen varias pentosanasas y actividades de hemicelulasa pueden mejorar la manipulación y la estabilidad de la masa, y mejoran la frescura, la estructura de miga y el volumen del pan.

Mediante la hidrolización de la fracción de pentosanos en harina se perderá una gran medida de su capacidad higroscópica, y el agua luego estará disponible para el almidón y el gluten. El gluten se vuelve más plegable y extensible, y el almidón se gelatinizará más fácilmente. Las pentosanasas pueden ser usadas en combinación con o como una alternativa de los emulsionantes.

Además las carbohidrasas son usadas para producir jarabes de almidón, son muy utilizadas en refrescos, dulces, productos de carne, productos lácteos, productos del pan, helado, alimentos para bebés, jamón etc.

La conversión del almidón es normalmente realizada en tres fases. Primero el almidón es licuado, por el uso de α -amilasas. Las maltodextrinas, en primer lugar consisten en oligosacáridos y se obtienen dextrinas.

La mezcla es luego tratada con una amiloglucosidasa para hidrolizar los oligosacáridos y las dextrinas en glucosa. De esta manera se obtiene un edulcorante. Si se desean jarabes ricos en maltosa, se deben usar las α -amilasas solas o en combinación con una pululanasa (enzima desramificante).

La mezcla de glucosa puede ser hecha incluso más dulce mediante la isomerización a fructosa. Para este propósito, se puede utilizar una glucosa isomerasa inmovilizada.

En la industria del azúcar, es una práctica común el hecho de acelerar la descomposición del almidón en los zumos de caña. De ese modo el contenido de almidón en el azúcar crudo se reduce y se facilita la filtración en la refinería.

Además las dextranasas se utilizan para descomponer el dextrano en zumos y jarabes de azúcar crudo.

En la industria del alcohol, las α -amilasas están siendo usadas ventajosamente para la dilución del almidón en las mezclas de destilación.

En la industria cervecera, las α -amilasas son usadas para la licuefacción adicional.

En la industria lechera, las β -galactosidasas (lactasas) son usadas para producir leche de lactosa para personas que padecen una mala absorción de la lactosa.

Cuando las bebidas lácteas aromatizadas son producidas a partir de leche tratada con lactasa, la adición de azúcar puede ser reducida sin reducir el dulzor del producto.

En la producción de leche condensada, la cristalización de lactosa puede ser evitada por el tratamiento de la lactasa, y por lo tanto se reduce el riesgo de espesamiento provocado por la coagulación de la caseína en cristales de lactosa.

Para la fabricación de helado, producido a partir de leche tratada con lactasa (o lactosuero) no se formará ningún cristal de lactosa ni se producirá el defecto de la arenosidad.

Además, las xilanasas son conocidas para su uso en varias aplicaciones industriales en alimentos/piensos como se describe en WO 94/21785 (Novo Nordisk A/S).

Las α -amilasas se usan en la industria de los piensos para ser añadidas a piensos con contenido en cereales para mejorar la digestibilidad del almidón.

Polipéptidos antimicrobianos

Se pueden usar algunas enzimas bacteriolíticas p. ej. para lavar carcasas en la industria del envasado de la carne (ver patente estadounidense N° 5,3354,681 de Novo Industri A/S)

Transferasas

Las transglutaminasas con alergenidad reducida producidas según la invención pueden ventajosamente ser usadas en la fabricación de alimentos y piensos.

Las transglutaminasas tienen la capacidad de reticular proteínas. Esta propiedad puede ser usada para la gelificación de las fases acuosas que contienen proteínas. Esto puede ser usado para fabricar productos para untar (solicitud de patente danesa N° 1071/84 de Novo Nordisk A/S).

Las transglutaminasas son usadas para la mejora de la calidad de la cocción de la harina p. ej. modificando la harina de trigo que debe ser usada en la preparación de pasteles con propiedades mejoradas, tales como mejora del sabor, de la sensación al morder, de la sensación en la boca y mayor volumen (ver JP 1-110147).

Además la producción de materia alimentaria del tipo de la pasta p. ej. usada como sustituto en alimentos tales como el helado, guarniciones, postres congelados, mayonesa y productos para untar bajos en grasa (ver WO 93/22930 de Novo Nordisk A/S).

Además para la preparación de geles para yogur, mousse, queso, pudins, zumos de naranja, derivados de productos lácteos y del tipo de los lácteos, y unión de productos de carne picada, mejora del sabor y textura de las proteínas alimentarias (ver WO 94/21120 y WO 94/21129 de Novo Nordisk A/S).

Fitasas

Las fitasas producidas según el método de la invención pueden ventajosamente ser usadas en la fabricación de alimentos, tales como cereales para el desayuno, pasteles, dulces, bebida, pan o sopa etc., y piensos.

Las fitasas pueden ser usadas bien para aprovechar el fósforo unido al fitato/ácido fítico presente en las fuentes de proteínas vegetales o para aprovechar los minerales nutricionalmente importantes unidos en los complejos del ácido fítico.

La fitasa microbiana puede ser añadida a los piensos de animales monogástricos para evitar la suplementación del alimento con fósforo inorgánico (ver patente estadounidense N. 3,297,548).

Además las fitasas pueden ser usadas para el tratamiento de la soja. Alimentos con semilla de soja pueden contener niveles altos de fitato de factor antinutritivo el cual convierte a esta fuente proteica en inadecuada para la aplicación en alimentos para bebés y alimentos para peces, terneros y otros no rumiantes, puesto que el fitato realiza la quelación de los minerales esenciales presentes en los mismos. (ver EP 0 420 358).

También para la cocción al horno se pueden usar las fitasas. Se puede preparar pan con mejor calidad mediante la cocción de pedazos divididos de una masa conteniendo harina de trigo etc. y fitasa (ver JP-0-3076529-A).

Se conoce una alta actividad fitasa en la preparación del koji para producir sake refinado (ver JP-06-6070749-A).

Aplicaciones textiles

Proteasas

Las proteasas se usan para el desengomado y la limpieza de impurezas de la seda.

Lipasas

Las lipasas son usadas para la eliminación de la materia grasa que contienen ésteres hidrofóbicos (p. ej. triglicéridos) durante el acabado de textiles (ver p. ej. WO 93/13256 de Novo Nordisk A/S).

Oxidoreductasas

En la limpieza total por blanqueamiento de textiles, las catalasas pueden servir para eliminar el peróxido de hidrógeno en exceso.

Carbohidrasas

Las enzimas celulolíticas son muy usadas en el acabado de prendas de tela vaquera para proporcionar una variación localizada en la densidad del color del tejido (enzima denominada "stone wash").

Las enzimas celulolíticas también encuentran utilidad en el proceso de biopulido. El biopulido es un tratamiento específico de la superficie del hilo que mejora la calidad del tejido con respecto a la manipulación y apariencia sin pérdida de humectabilidad del tejido. El biopulido puede ser obtenido aplicando el método descrito p. ej. en WO 93/20278.

Durante el tejido de textiles, los hilos son expuestos a una tensión mecánica considerable. Para evitar la rotura, los hilos son normalmente reforzados por el revestimiento (encolado) de una sustancia gelatinosa (cola). El agente de encolado más común es el almidón en forma nativa o modificada. Un acabado uniforme y duradero puede ser obtenido de esta manera, sólo después de la eliminación de la cola del tejido, proceso denominado desencolado. El desencolado de tejidos encolados con una cola conteniendo almidón o almidón modificado es preferiblemente facilitado por el uso de enzimas amilolíticas.

Fármacos orales y dérmicos

Proteasas

Diferentes combinaciones de proteasas altamente purificadas (p. ej. Tripsina y Quimiotripsina) se utilizan en fármacos para ingerir oralmente, y fármacos dérmicos para combatir p. ej. inflamaciones, edemas y heridas.

Fabricación del cuero

Transferasa

La tansglutaminasa es conocida para el uso en el acabado con caseína del cuero actuando como un endurecedor (ver WO 94/13869 de Novo Nordisk).

Limpieza de superficies duras

La limpieza de superficies duras p. ej. en la industria alimentaria es frecuentemente difícil, puesto que el equipo usado para producir productos lácteos, carne, productos de marisco, bebidas etc. frecuentemente tiene una forma complicada. El uso de composiciones tensioactivas en forma de geles y espumas con contenido en enzimas ha demostrado que facilita y mejora la limpieza de las superficies duras. Las enzimas, que pueden ser añadidas de forma ventajosa a tales composiciones tensioactivas, son en particular las proteasas, lipasas, amilasas y celulasas.

Estas composiciones de limpieza de superficies duras comprendiendo enzimas pueden también ser usadas de forma ventajosa en el sector del transporte, por ejemplo para el lavado de coches y para el lavado de recipientes en general.

Finalmente la invención se refiere al uso de la proteína producida según el método de la invención o una composición que comprende la proteína en productos comprendiendo polipéptidos.

En primer lugar, el conjugado o composición producidos según la invención pueden ser usados de forma ventajosa para productos para el cuidado personal, tales como productos para el cuidado del cabello y para el tratamiento del cabello. Esto incluye productos tales como champú, acondicionadores del cabello, composiciones para ondular el cabello, composiciones para teñir el cabello, tónicos para el cabello, líquidos para el cabello, crema para el cabello, enjuague para el cabello, spray para el cabello.

También están contemplados los productos para el cuidado oral, tales como los dentífricos, enjuague bucal, goma de mascar.

También están contemplados los productos para el cuidado de la piel como los cosméticos, tales como crema para la piel, leche para la piel, crema limpiadora, loción limpiadora, leche limpiadora, crema hidratante, jabón en crema, esencia nutritiva, loción para la piel, loción láctea, loción de calamina, crema de manos, jabón en polvo, jabón transparente, aceite solar, pantalla solar, espuma de afeitar, crema de afeitar, aceite para bebés, barras de labios, crema de labios, crema de base, polvos para la cara, sombras de ojos en polvo, polvos, crema base, base de maquillaje, esencia en polvo, polvos blanqueadores.

También para productos para la higiene de lentes de contacto el conjugado de la invención puede ser usado de forma ventajosa. Estos productos incluyen productos para la limpieza y desinfección de lentes de contacto.

El uso de detergentes tales como detergente en polvo, jabón, pastillas de jabón, jabón líquido está también contemplado.

La invención puede implicar el uso de un constructo de ADN de codificación de una variante de proteína glicosilada y un vector de expresión comprendiendo el constructo de ADN. El vector de expresión puede ser cualquier vector sometido al procedimiento del ADN recombinante, seguido de la expresión exitosa en un organismo huésped. Al introducirse en el organismo huésped el vector puede funcionar en una forma autónoma. Mediante un origen de replicación el plásmido puede replicarse fuera del genoma de la célula huésped. De forma alternativa, se puede incorporar en el genoma de la célula huésped y replicarse con el genoma de la célula huésped.

Además la presente invención puede implicar un proceso con el cual una variante de proteína glicosilada es sintetizada y expresada. Las fases con respecto a la creación del producto final se consiguen mediante el cultivo de un huésped capaz de glicosilar y expresar una proteína en un medio adecuado para obtener la expresión y secreción de la variante de la proteína glicosilada en el medio. Después de esto se produce la recuperación y el aislamiento de la proteína del medio de cultivo.

Otro aspecto de la presente invención es la producción de variantes de proteínas en una célula huésped. La célula huésped puede ser cualquier célula adecuada para la producción a gran escala de proteínas, capaz de expresar una proteína y de ser transformada por un vector de expresión. Otro aspecto de la presente invención es un huésped capaz de realizar la glicosilación. El huésped puede ser seleccionado de células bacterianas, fúngicas, animales o de células vegetales transgénicas. Las células animales pueden ser células de insectos o mamíferos, por ejemplo.

En una forma de realización, el huésped es levadura. La célula de levadura puede ser seleccionada de los grupos que consisten en *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvae*, *Saccharomyces kluyveri*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces uvarum*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia kluyveri*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida sp.*, *Candida utilis*, *Candida cacaoi*, *Geotrichum sp.*, y *Geotrichum fermentans*.

En otra forma de realización el huésped es seleccionado entre otros hongos, tales como *Humicola lanuginosa* o *Aspergillus oryzae*.

En otra forma de realización el huésped es seleccionado de células vegetales, tales como células vegetales transgénicas, por ejemplo células de patata, o bien el huésped es seleccionado entre células animales, tales como células de insectos, por ejemplo células ováricas Sf9 y Sf21 de *Spodoptera frugiperda*, o células mamíferas, tales como células del mono CV1 y COS, fibroblastos de murina C127 y células ováricas de hámster chino (CHO).

El huésped seleccionado es cultivado en un medio adecuado, por el cual dicha variante de la proteína es expresada y glicosilada en el huésped. Finalmente la variante de la proteína glicosilada es recuperada del medio.

Haciendo una elección específica del huésped es posible seleccionar la naturaleza de la glicosilación de la variante de la proteína glicosilada.

Materiales y métodos

Materiales

Enzimas:

Lipolasa: Lipasa derivada de la cepa DSM 4109 de *Thermomyces lanuginosus* (*Humicola lanuginosa*) mediante ingeniería genética.

Materiales, productos químicos y soluciones:

Peroxidasa de rábano picante (horseradish) marcada con anti-Ig de rata (Dako, DK, P162, # 031; dilución 1:1000).
IgE de rata anti-ratón (Serotec MCA193; dilución 1:200).

Anti IgE de rata (Serotec MCA419; dilución 1:100).

Anticuerpo monoclonal IgG1 de ratón anti-rata marcado con biotina (Zymed 03-9140; dilución 1:1000)

Anticuerpo monoclonal IgG1 de rata anti-ratón marcado con biotina (Serotec MCA336B; dilución 1:1000)

Estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (Kirkegård & Perry 14-30-00; dilución 1:1000).

Placas de NH₂ de CovaLink (Nunc, Cat# 459439)

Cloruro cianúrico (Aldrich)

Acetona (Merck)

IgG1 de rata anti-ratón, biotina (Serotec, Cat# MCA336B)

Estreptavidina, peroxidasa (KPL)

Orto-fenileno-diamina (OPD) (Kem-en-Tec)

ES 2 289 824 T3

H₂O₂, 30% (Merck)

Tween 20 (Merck)

5 Leche desnatada en polvo (Difco)

H₂SO₄ (Merck)

10 *Tampones y soluciones*

	Tampón carbonato (0.1 M, pH 10 (1 litro))	Na ₂ CO ₃	10.60 g
15	PBS (pH 7.2 (1 litro))	NaCl	8.00 g
		KCl	0.20 g
		K ₂ HPO ₄	1.04 g
		KH ₂ PO ₄	0.32 g
20	Tampón de lavado PBS; 0.05% (V/V) Tween 20		
	Tampón de bloqueo PBS; 2% (peso/V) leche desnatada en polvo		
	Tampón de dilución PBS; 0.05% (V/V) Tween 20, 0.5% (peso/V) leche desnatada en polvo		
	Tampón citrato (0.1M, pH 5.0-5.2 (1 litro)) Citrato de Na		20.60 g
25	Ácido cítrico		6.30 g

Activación de placas de CovaLink:

- 30 • hacer una solución madre fresca de 10 mg de cloruro cianúrico por ml de acetona.
- justo antes del uso, diluir la solución madre de cloruro cianúrico en PBS, mientras que se agita, hasta una concentración final de 1 mg/ml.
- 35 • añadir 100 ml de la dilución a cada pocillo de las placas de NH₂ de CovaLink, e incubar durante 5 minutos a la temperatura ambiente.
- lavar 3 veces con PBS.
- 40 • secar las placas activadas recién preparadas a 50°C durante 30 minutos.
- sellar de inmediato cada placa con cinta de sellado.
- 45 • las placas preactivadas pueden ser almacenadas a la temperatura ambiente durante 3 semanas si se mantienen en una bolsa de plástico.

Borato sódico, borax (Sigma)

ácido 3,3-dimetil glutárico (Sigma)

50 CaCl₂ (Sigma)

Cloruro de tresilo (cloruro de 2,2,2-trifluoroetansulfonilo) (Fluka)

55 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) (Fluka)

N-hidroxi succinimida (Fluka art. 56480)

Fosgeno (Fluka art. 79380)

60 Lactosa (Merck 7656)

PMSF (fenil metil sulfonil fluoruro) de Sigma

65 Succinil-alanina-alanina-prolina-fenilalanina-para-nitroanilida (Suc-AAPF-pNP)

Sigma no. S-7388, PM 624.6 g/mol.

ES 2 289 824 T3

Sustrato colorante:

OPD: O-fenileno-diamina, (Kementec cat n°. 4260)

Animales para la prueba:

Ratones Balb/C hembra (aproximadamente 20 gramos) comprados a Bomholdt-gaard, Ry, Dinamarca.

Ratas Brown-Norway hembra, con un peso medio de 180 g

Equipo:

XCEL II (Novex)

Lector ELISA (UVmax, dispositivos moleculares)

HPLC (Waters)

PFLC (Pharmacia)

Columna Superdex-75, mono-Q, mono S de Pharmacia, SW.

SLT: Fotómetro de SLT LabInstruments

Cromatógrafo de exclusión por tamaños (Sphergel TSK-G2000 SW).

Cromatógrafo de exclusión por tamaños (Superdex 200, Pharmacia, SW)

Célula amicon

Enzimas para manipulaciones del ADN

A menos que se indique lo contrario todas las enzimas para las manipulaciones del ADN, tales como p. ej. endonucleasas de restricción, ligasas etc., se obtienen de New England BioLabs. Inc.

Medios

BPX: composición (por litro)

Almidón de patata	100 g
Cebada molida	50 g
Harina de soja	20 g
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	9 g
Plurónico	0.1 g
Caseinato sódico	10 g

El almidón del medio es licuado con α -amilasa y el medio es esterilizado calentando a 120°C durante 45 minutos. Después de la esterilización el pH del medio es ajustado a 9 por la adición de NaHCO₃ a 0.1 M.

Métodos

Métodos generales de biología molecular

A menos que se indique lo contrario, las manipulaciones y transformaciones del ADN fueron realizadas usando métodos estándares de biología molecular (Sambrook *et al.* (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor lab., Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, F.M. *et al.*, (eds.) "Current protocols in Molecular Biology". John Wiley and Sons, 1995; Harwood, C.R., y Cutting, S. M. (eds.) "Molecular Biological Methods for Bacillus". John Wiley and Sons, 1990). Las enzimas para las manipulaciones del ADN fueron usadas según las especificaciones de los proveedores.

Inmunización de ratones

Ratones Balb/C (20 gramos) son inmunizados 10 veces (intervalos de 14 días) por inyección subcutánea del polipéptido modificado o sin modificar en cuestión, respectivamente por procedimientos estándares conocidos en la técnica.

Inmunización de ratas

Se realizaron veinte inmunizaciones semanales intratraqueales en ratas con 100 μ l de NaCl (grupo de control) al 0.9% (peso/vol) o 100 μ l de la dilución de la proteína mencionada anteriormente. El grupo 1 recibió lipolasa de tipo salvaje, el grupo 2 recibió lipolasa variante#1, y el grupo 3 recibió lipolasa variante#5. Cada grupo contenía 10 ratas. Se tomaron muestras de sangre (2 ml) del ojo una semana después de cada segunda inmunización. El suero se obtuvo por coagulación y centrifugación de la sangre.

Sistema de prueba de IgE con ELISA (para ratas de Brown Norway)

Un sándwich ELISA de tres capas se utiliza para determinar concentraciones relativas de anticuerpos específicos.

La molécula de inmunización se usa como antígeno de revestimiento con 10 mg por ml y 50 ml por pocillo, en un tampón fosfato neutro, incubado durante toda la noche a 4°C. Todos los puntos de unión restantes en la superficie del pocillo son bloqueados en un 2% de leche desnatada; 200 ml por pocillo en tampón fosfato durante al menos 30 minutos a la temperatura ambiente (TA). Todos los sueros que deben evaluarse con este antígeno son agregados a 50 ml por pocillo a esta placa usando una pipeta de 8 canales en serie de 10 diluciones seguido de diluciones triples. Las diluciones han sido realizadas en un tampón fosfato con un 0.5% de leche desnatada y 0.05% Tween20, incubadas durante 2 horas en una plataforma de agitación a TA. La molécula "trazadora" es IgE de ratón anti-rata marcada con biotina 50 ml por pocillo y diluida 2000 x en tampón fosfato con un 0.5% de leche desnatada y un 0.05% de Tween 20, incubada 2 horas en una plataforma de agitación a TA. La secuencia de control (en blanco) fue idéntica pero sin sueros de rata. 50 ml por pocillo de estreptavidina peroxidasa de rábano picante, diluida 2000 x fue incubada 1 hora en una plataforma de agitación. El sustrato colorante a 50 ml por pocillo es OPD (6 mg) y H₂O₂ (4 ml de una solución al 30%) por 10 ml tampón citrato pH 5.2. La reacción es detenida usando 100 ml por pocillo 2 N H₂SO₄. Todas las lecturas en SLT a 486 nm y 620 nm como referencia. Los datos se calculan y presentan en Lotus.

Procedimiento de ELISA para determinar las concentraciones relativas de anticuerpos IgE en ratones Balb/C

Un sándwich ELISA de tres capas se utiliza para determinar concentraciones relativas de anticuerpos de suero IgE específicos.

1) revestir la placa ELISA con 10 mg de IgE de rata anti-ratón o IgE de ratón anti-rata/ml tampón 1. 50 ml/pocillo. Incubar durante la noche a 4°C.

2) Vaciar las placas y bloquear con tampón de bloqueo al menos 1/2 hora a la temperatura ambiente. 200 ml/pocillo. Agitar suavemente. Lavar las placas 3 veces con tampón de lavado.

3) Incubar con sueros de ratón/rata, empezando por los no diluidos y continuando con diluciones dobles. Guardar algunos pocillos libres para tampón 4 sólo (blancos). 50 ml/pocillo. Incubar durante 30 minutos a la temperatura ambiente. Agitar suavemente. Lavar las placas 3 veces en tampón de lavado.

4) Diluir la enzima en tampón de dilución a la concentración de proteína apropiada. 50 ml/pocillo. Incubar durante 30 minutos a la temperatura ambiente. Agitar suavemente. Lavar las placas 3 veces en tampón de lavado.

5) Diluir suero anti-suero (plg) anti-enzima policlonal específico para detectar el anticuerpo unido en el tampón de dilución. 50 ml/pocillo. Incubar durante 30 minutos a la temperatura ambiente. Agitar suavemente. Lavar las placas 3 veces en tampón de lavado.

6) Diluir el anticuerpo anti-plg del conjugado de peroxidasa de rábano picante en el tampón de dilución. 50 ml/pocillo. Incubar a la temperatura ambiente durante 30 minutos. Agitar suavemente. Lavar las placas 3 veces en un tampón de lavado.

7) mezclar 0.6 mg de ODP/ml + 0.4 μ l de H₂O₂/ml en tampón de sustrato. Hacer la solución justo antes del uso. Incubar durante 10 minutos. 50 μ l/pocillo.

8) para detener la reacción: añadir una solución de detención. 50 μ l/pocillo.

9) leer las placas a 492 nm con 620 nm como referencia. Los datos se calculan y presentan en Lotus.

ES 2 289 824 T3

Procedimiento ELISA para IgG de ratones Balb/C:

- el antígeno es diluido a 1 mg/ml en tampón carbonato.
- 5 • 100 μ l se añade a cada pocillo.
- las placas son cubiertas durante toda la noche a 4°C.
- 10 • la adsorción no específica es bloqueada incubando cada pocillo durante 1 hora a la temperatura ambiente con 200 μ l de tampón de bloqueo.
- las placas son lavadas 3x con 300 μ l de tampón de lavado.
- 15 • sueros de ratón desconocido son diluidos en el tampón de dilución, normalmente 10x; 20x y 40x, o más.
- se añaden 100 μ l a cada pocillo.
- la incubación se hace durante 1 hora a la temperatura ambiente.
- 20 • el material no enlazado es quitado mediante lavado 3x con tampón de lavado.
- el anticuerpo IgG1 anti-ratón es diluido 2000x en tampón de dilución.
- Se añaden 100 μ l a cada pocillo.
- 25 • la incubación se hace durante 1 hora a la temperatura ambiente.
- el material no enlazado es quitado mediante lavado 3x con tampón de lavado.
- 30 • Estreptavidina es diluida 1000x en tampón de dilución.
- Se añaden 100 μ l a cada pocillo.
- 35 • la incubación se hace durante 1 hora a la temperatura ambiente.
- el material no enlazado es quitado mediante lavado 3x con 300 μ l de tampón de lavado.
- OPD (0.6 mg/ml) y H₂O₂ (0.4 ml/ml) es disuelto en tampón de citrato.
- 40 • 100 μ l se añade a cada pocillo.
- la incubación se hace durante 10 minutos a la temperatura ambiente.
- la reacción es detenida añadiendo 100 μ l de H₂SO₄.
- 45 • las placas se leen a 492 nm con 620 nm como referencia.

Métodos moleculares biológicos

- 50 La mutagénesis sitio dirigida, clonación y expresión de variantes enzimáticas en levadura y purificación de las variantes fueron realizadas según las tecnologías del estado de la técnica.

55 Detección de ELISA de IgE de rata antígeno-específica: esta ELISA es una ELISA de captación, y fue realizada en placas de NH₂ de CovaLink activadas con cloruro cianúrico como se describe por el fabricante. La ELISA fue realizada en suero salino tamponado con fosfato bajo condiciones comúnmente conocidas. Las placas fueron revestidas durante toda la noche con 100 μ l de IgE de ratón anti-Rata (5 μ g/ml). Después de esta fase, se añadió Tween 20 a las soluciones de tampón a una concentración final de 0.01% (v/v). La adsorción no específica fue bloqueada con 2% (p/v) de leche desnatada. Los sueros de rata desconocidos fueron diluidos en 0.5% (p/v) de leche desnatada, normalmente 10 x; 20 x y 40 x, y fueron añadidos a los pocillos. La lipolasa fue diluida a 1 μ g/ml en 0.5% (p/v) de leche desnatada, y 60 100 μ l fueron añadidos a cada pocillo. La enzima inmovilizada fue detectada con suero antígeno-específico policlonal en 0.5% (p/v) de leche desnatada. Las inmunoglobulinas de anti-lipolasa fueron detectadas usando anticuerpos de inmunoglobulina de anticonejo marcados con peroxidasa de rábano picante.

65 Detección de ELISA de IgG1 de rata antígeno-específica: esta ELISA es una ELISA directa, y fue realizada en placas de NH₂ de CovaLink activadas con cloruro cianúrico como se describe por el fabricante. La ELISA fue realizada en suero salino tamponado con fosfato bajo condiciones comúnmente conocidas. Las placas fueron cubiertas durante toda la noche con 100 μ l de antígeno (5 μ g/ml.). Después de esta fase Tween 20 fue añadida a las soluciones tampón a una concentración final del 0.01% (v/v). La adsorción no específica fue bloqueada con un 2% de leche desnatada.

Sueros de rata desconocidos fueron diluidos en un 0.5% (p/v) de leche desnatada, normalmente 10 x; 20 x y 40 x, y fueron añadidos a los pocillos. IgG1 de rata antígeno-específico inmovilizado fue detectado usando un IgG1 de ratón anti- rata marcado con biotina en un 0.5% (p/v) de leche desnatada. IgG1 de ratón anti-rata inmovilizado fue detectado usando una peroxidasa de rábano picante unida a estreptavidina.

5 *Análisis estadístico*

Las diferencias entre los datos fueron analizadas usando métodos no paramétricos: el test de Kruskal-Wallis y el test de comparación múltiple de Dunn.

10 **Ejemplos**

Los experimentos siguientes ilustran la reducción de alergenicidad de la lipasa enzimática (E.C.3.1.1.3) de la cepa DSM 4109 de *Thermomyces lanuginosus* (Humicola lanuginosa) mediante ingeniería genética. La enzima fue provista de sitios de glicosilación extra en áreas específicas de la enzima.

Ejemplo 1

20 *Identificación de epítomos y selección de la variante*

Las variantes de la lipasa fueron designadas para introducir sitios de glicosilación adicionales de la secuencia de consenso Asn- Xaa-Thr/Ser. Primero, los epítomos en la lipasa de tipo salvaje fueron identificados, para elegir sitios de glicosilación, para maximizar los efectos de tanto el barrido de macrófagos como de la protección de los epítomos.

Para identificar modelos de epítomos, se seleccionaron bibliotecas de expresión en el fago expresando secuencias peptídicas aleatorias (9-meros) con IgG purificado de antisueros de anti-lipasa de conejo por precipitación de ácido caprílico. Los anticuerpos IgG fueron inmovilizados en microesferas paramagnéticas portadoras de anticuerpos IgG anticonejo específicos, como se describe por el fabricante (Sigma). El material no enlazado fue eliminado y las microesferas cubiertas fueron aisladas e incubadas con la biblioteca de expresión en el fago que expresa oligopéptidos 9-meros con secuencias de aminoácidos aleatorias. Los fagos unidos fueron eluidos de las microesferas e incubados con una cepa de *Escheria coli* apropiada en presencia de un fago portador y luego colocados en placas en línea con el estado de la técnica existente. Las placas que presentaban placas fueron seleccionadas por su enlace específico a anticuerpos de anti-lipasa según el estado de la técnica. Para cada placa dos copias fueron realizadas en filtros de nitrocelulosa. El filtro #1 fue incubado con IgG lipasa-específico purificado mientras que el filtro #2 fue incubado con IgG lipasa-específico purificado en presencia de lipasa en exceso. Ambos filtros fueron desarrollados usando IgG de anticonejo marcado con fosfatasa alcalina. Las placas que aparecieron en el filtro #1 pero no en el filtro #2, fueron seleccionadas y cultivadas según el estado de la técnica. Las secuencias de oligopeptidos reactivos fueron identificadas por análisis de la secuencia de ADN automatizado, y sus secuencias fueron alineadas para identificar 5 epítomos importantes:

40 1. RPPR

2. > EY

45 3. P > PAP > S

4. > RSA

50 5. L > GRS

Estos modelos de epítomos fueron localizados en la estructura 3D de la molécula de lipasa (1tib.pdb) por análisis por ordenador. Se representaron en la extensión N-terminal (lip.1) y hasta las posiciones alrededor de los residuos E129-Y164 (lip.2.1), E129- Y220 (lip.2.2-4), P253-P250-A243-P208/207-S214/216/217 (lip.3.0), R209-S214-Y220 (lip.4.0), L67-G65-R81-S83/85 (lip.5.1) y L96/97-G212-R209/179-S214 (lip.5.2), respectivamente (figura 1).

Según la información obtenida de la selección de la exposición en el fago, las variantes con sitios de glicosilación adicionales cerca de estos epítomos fueron construidas mediante ingeniería proteica. La Figura 1 muestra dos de estas variantes, #1 con un sitio de glicosilación adicional y #5 con 4 sitios de glicosilación adicionales. La lipasa en sí misma tiene un sitio de glicosilación (N33 = Asn₃₃-Ile₃₄-Thr₃₅) situado a una distancia desde los epítomos identificados. En la variante #1 se predice un epítopo que será afectado por el sitio de glicosilación extra, mientras que 3 epítomos están afectados por la extraglicosilación en la variante #5.

TABLA 1

Sustituciones introducidas para crear sitios de glicosilación adicionales

Variante	Sitios de glicosilación	Sustituciones correspondientes	Epítipo afectado
tipo salvaje	N33	ninguna	
#1	N33 N99	E99N,N101S	lip.5.2
#5	N33 N37 N99 N163 N212	T37N,N39S E99N,N101S G163N,D165S G212N	lip.2.1 lip.2.2-4 lip.3.0 lip.4.0 lip.5.2

Ejemplo 2

Construcción y expresión de variantes glicosiladas

La mutagénesis sitio dirigida y la clonación de las variantes enzimáticas fueron realizadas por técnicas estándares bien conocidas en la técnica (ver, p. ej., Sambrook *et al.* (1989), Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning. A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY; Ford *et al.*, 1991, *Protein Expression and Purification 2*, págs. 95-107. La secuencia de genes de la lipasa de tipo salvaje puede ser encontrada en la base de datos EMBL/GenBank con el número de acceso AF054513, y el vector usado fue CaHj483 (WO 99/42566). Los vectores de expresión resultantes fueron transformados en *Aspergillus oryzae* JaL 228 (PCT/DK 97/00037) usando la selección en acetamida como se describe en la patente EP 531 372 B1. Los Transformantes fueron esporas reaisladas fermentadas en frascos de agitación para producir las variantes de la lipasa. Las variantes de la lipasa resultantes fueron recuperadas por métodos conocidos en la técnica (Svendsen *et al.*, *Methods in Enzymology*, vol. 284, págs. 317-340, 1997).

Así, las variantes de la lipasa fueron expresadas en *Aspergillus oryzae*, que es conocida por ser capaz de realizar la glicosilación. Las variantes de lipasa segregadas fueron glicosiladas en las células como se demuestra por el desvío de la movilidad de las variantes en comparación con el tipo salvaje en el análisis de Western blot (figura 2). Además, la migración lenta de la variante (#5) con más sitios de glicosilación indica que la extensión de la glicosilación está correlacionada con el número de sitios de glicosilación introducidos en la secuencia, como estaba previsto.

Ejemplo 3

Funcionalidad retenida de las variantes

La lipasa de tipo salvaje y las variantes fueron purificadas y su actividad específica fue determinada. De forma resumida, un sustrato para lipasa es preparado mediante la emulsión de tributirato de glicerina usando goma arábica como emulsionante. La actividad de la lipasa es evaluada a pH 7 usando el método de pH stat. Una unidad de actividad lipasa (LU) está definida como la cantidad necesaria para liberar un micromol de ácidos grasos por minuto (Svendsen *et al.*, *Methods in Enzymology*, vol. 284, págs. 317-340, 1997).

La actividad es expresada como LU/ml de soluciones con la misma concentración de proteína, determinada por la medición de A280. La lipasa de tipo salvaje tiene una actividad de 4917 LU/ml, la variante #1 tiene 4478 LU/ml y la variante #5 tiene 4222 LU/ml. Por lo tanto, las variantes tienen esencialmente la misma funcionalidad que la lipasa de tipo salvaje.

Ejemplo 4

Estudios IT de rata (IgG/IgE)

Las potencias antigénicas y alérgicas de las variantes #1 y #5 y de la lipasa de tipo salvaje fueron comparadas en un modelo de rata con exposición intratraqueal al antígeno.

Inmunización: Veinte inmunizaciones intratraqueales semanales fueron realizadas en ratas (ratas de Brown-Norway hembras con un promedio de peso de 180 g) con 100 μ l de NaCl (grupo de control) al 0.9% (peso/vol) o 100 μ l de solución salina conteniendo 15 μ g de proteína. El grupo 1 recibió lipasa de tipo salvaje, el grupo 2 recibió la variante de lipasa #1, y el grupo 3 recibió la variante de lipasa #5. Cada grupo contenía 10 ratas. Se tomaron muestras de sangre (2 ml) del ojo una semana después de cada segunda inmunización. El suero se obtuvo por coagulación y centrifugación de la sangre.

Detección de ELISA de IgE de rata antígeno-específica: este ELISA es un ELISA de captación, y se realizó en placas de NH₂ de CovaLink (Nunc, Dinamarca) activada con cloruro cianúrico como se describe por el fabricante. El análisis ELISA fue realizado en suero salino tamponado con fosfato bajo condiciones estándares. Las placas fueron cubiertas durante toda la noche con 100 μ l de IgE de ratón anti-rata (5 μ g/ml). Después de esta fase, Tween 20 fue añadida a las soluciones tampón a una concentración final del 0.01% (v/v). La adsorción no específica fue bloqueada con un 2% (p/v) de leche desnatada. Sueros de rata desconocidos fueron diluidos en un 0.5% (p/v) de leche desnatada, normalmente 10 x; 20 x y 40 x, y fueron añadidos a los pocillos. La lipasa fue diluida a 1 μ g/ml en 0.5% (p/v) de leche desnatada, y 100 μ l fueron añadidos a cada pocillo. La enzima inmovilizada fue detectada con suero específico de antígeno policlonal en un 0.5% (p/v) de leche desnatada. Las inmunoglobulinas anti-lipasa fueron detectadas usando anticuerpos de inmunoglobulina anticonejo marcados con peroxidasa de rábano picante.

Detección en ELISA de IgG1 de rata antígeno-específico: este análisis ELISA es un ELISA directo, y se realizó en placas de NH₂ de CovaLink (Nunc, Dinamarca) activadas con cloruro cianúrico según está descrito por el fabricante. El análisis ELISA se realizó en suero salino tamponado con fosfato bajo condiciones estándares. Las placas fueron cubiertas durante toda la noche con 100 μ l de antígeno (5 μ g/ml). Después de esta fase, Tween 20 fue añadido a las soluciones tampón a una concentración final del 0.01% (v/v). La adsorción no específica fue bloqueada con el 2% de leche desnatada. Los sueros de rata desconocidos fueron diluidos en 0.5% (p/v) de leche desnatada, normalmente 10 x; 20 x y 40 x, y fueron añadidos a los pocillos. IgG1 de rata inmovilizado antígeno-específico fue detectado usando un IgG1 de ratón anti-rata marcado con biotina en un 0.5% (p/v) de leche desnatada. IgG1 de ratón anti-rata inmovilizado fue detectado usando una peroxidasa de rábano picante unida a estreptavidina.

Las diferencias entre los datos fueron analizadas usando métodos no paramétricos: el test de Kruskal-Wallis y el test de comparación múltiple de Dunn. La alergenicidad está resumida como “el nivel de anticuerpos IgE en el punto final” y el “nivel de respuesta de los anticuerpos IgE integrados” en todo el experimento.

La Figura 3 muestra cómo la alergenicidad de las variantes de lipasa, determinadas por la respuesta de los IgE integrados, decrece mientras que el número de sitios de glicosilación aumenta. La tabla 2 muestra cómo la alergenicidad del punto final de las variantes de lipasa, determinadas por la respuesta de los IgE, también decrece mientras que el número de sitios de glicosilación aumenta. La antigenicidad de las variantes, determinada como la respuesta de los IgG1 es, no obstante, bien constante o elevada, lo último posiblemente se debe a las propiedades antigénicas de las cadenas de glicosilo.

TABLA 2

Niveles de respuesta de los anticuerpos del punto final en el modelo IT de rata

Enzima	Respuesta de los IgG1 (antigenicidad) (%)	respuesta de los IgE (alergenicidad) (%)
Lipasa	100	100
Variante #1	182	71
Variante #5	93	42

Ejemplo 5

Estudios SC en ratones (IgG1 y IgE)

Las potencias antigénicas y alérgicas de las variantes #1 y #5 y de la lipasa de tipo salvaje fueron comparadas en un modelo de ratón con exposición subcutánea al antígeno.

El protocolo de inmunización fue similar al de los estudios en ratas (Ejemplo 4), a excepción de que las inmunizaciones fueron realizadas subcutáneamente con una concentración de proteína de 0,025 mg de proteína/ml y de que las muestras de sangre de sólo 100 μ l fueron recogidas de los animales más pequeños (ratones Balb/C hembra; 9 semanas de edad aproximadamente 20 g)

Los análisis ELISAs fueron realizados de un modo, esencialmente similar al de los estudios en ratas (Ejemplo 4), a excepción de que se utilizaron anticuerpos IgG1 anti-ratón e IgE anti-ratón, y de que las series de dilución fueron comenzadas a partir de 1:160 para el ELISA de IgG1 y a partir de los no diluidos para el ELISA de IgE.

Los resultados están mostrados en la figura 4. Se puede observar que la alergenicidad expresada como niveles de respuesta de los anticuerpos integrados (según está aceptado de forma común) es reducida para las variantes glicosiladas.

Así, la variante #5 muestra alergenicidad reducida en el modelo SC de ratón, pero es sólo una reducción limitada en alergenicidad en comparación con aquella observada en el modelo IT de rata (Ejemplo 4). La diferencia entre estos dos conjuntos de resultados indica que la alergenicidad reducida en las ratas está al menos parcialmente debida a un barrido aumentado por los macrófagos específicos para el pulmón, p. ej. los macrófagos alveolares. Esto concuerda con las observaciones hechas en la técnica anterior de que las proteínas inyectadas subcutáneamente tuvieron un efecto pequeño en los macrófagos alveolares (ver por ejemplo Halme *et al.*, J. Immunotherapy with Emphasis on Tumor Immunology, vol. 15, págs. 283-291, 1994, o Vasil'eva *et al.*, Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii I Imunobiologii (10), págs. 34-36, oct. 1991) y también con las observaciones de que los macrófagos alveolares, pero no intersticiales suprimen la función de células pulmonares dendríticas como estimuladores de proliferación de células T (Armstrong LR, Christensen PJ, Paine R III *et al* (1994) Am J Respir Cell Mol Biol 11: 682-691 y Holt PG, Oliver J, Bilye B *et al* (1993) J Exp Med: 397-407).

Hay sólo una reducción limitada en la alergenicidad de la variante #5 cuando se inyecta subcutáneamente en ratones. La diferencia entre estos resultados y aquellos obtenidos por instalación intratraqueal de las mismas proteínas en ratas (Ejemplo 4) indica que la alergenicidad reducida en las ratas se debe al menos parcialmente a la depuración aumentada por los macrófagos específicos para el pulmón, p. ej. macrófagos alveolares. Esto concuerda con las observaciones hechas en la técnica anterior con respecto a la extensión del efecto de las proteínas inyectadas subcutáneamente en los macrófagos alveolares (ver por ejemplo J. Immunotherapy with Emphasis on Tumor Immunology, vol. 15, págs. 283-291, 1994 o Zhurnal Epidemiologii I Imunobiologii (10), págs. 34-36, oct. 1991).

Ejemplo 6

ELISA competitivo

Experimentos de ELISA competitivos fueron realizados para lipasa tipo salvaje y las dos variantes usando métodos conocidos en la técnica con antisuero anti-lipasa policlonal específico de conejos y lipasa de tipo salvaje como competidor (ver p. ej. J. Clausen, Immunochemical Techniques For The Identification And Estimation Of Macromolecules, Elsevier, Amsterdam, 1988, págs. 187-188).

El tipo salvaje no tiene, por definición, ninguna pérdida de competitividad y una inhibición del punto final del 100%. La variante #1 tiene una pérdida doble de competitividad y una inhibición del punto final del 90%, mientras que la variante #5 tiene una pérdida de competitividad de 256 veces y una inhibición del punto final del 53%.

Los resultados indican que al menos una parte de la alergenicidad reducida puede ser debida a una antigenicidad reducida, que concuerda con el hecho de que los sitios de glicosilación lip.2.-4., lip.3.0, lip.4.0 y lip.5.2 están localizados en la proximidad de los epítomos de lipasa.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es sólo para la conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tenido mucho cuidado al compilar las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO renuncia a cualquier responsabilidad en este sentido.

Documentos de patente citados en la descripción

- WO9617929 [0006]
- WO9640792 [0006]
- WO9730148 [0006]
- WO9835026 [0006]
- WO981337 [0008]
- US5041376 [0009]
- WO9210755 [0029] [0033]

ES 2 289 824 T3

- EP130756 Genentech [0042]
- EP214435 Henkel [0042]
- 5 • WO8704461 Amgen [0042]
- WO8705050 Genex [0042]
- EP251446 Genencor [0042]
- 10 • EP260105 Genencor [0042]
- WO8808028 Genex [0042]
- 15 • WO8808033 Amgen [0042]
- WO8906279 Novo Nordisk A/S [0042]
- WO9100345 Novo Nordisk A/S [0042]
- 20 • EP525610 Solvay [0042]
- WO9402618 Gist-Brocades N.V. [0042]
- 25 • US4810414 *H. brevispora*, *H. lanuginosa*, *H. brevis* var. *thermoidea* and *H. insolens* [0046]
- WO8904361 *Ps. fragi*, *Ps. stutzeri*, *Ps. cepacia* and *Ps. fluorescens* [0046]
- US4950417 *Ps. plantarii* or *Ps. gladioli* [0046]
- 30 • EP218272 *Ps. alcaligenes* and *Ps. pseudoalcaligenes* [0046]
- WO8809367 *Ps. mendocina* [0046]
- 35 • US5389536 [0046]
- EP130064 *F. oxysporum* [0046]
- WO9009446 *F. solani pisi* [0046]
- 40 • EP238023 *M. miehei* [0046]
- WO8802775 *C. antarctica* [0046]
- 45 • WO9401 541 [0046]
- WO8902916 [0046]
- JP647744992 *B. stearrowthermophilus* [0046]
- 50 • WO9116422 *B. pumilus* [0046]
- WO9301285 [0049]
- 55 • WO9522615 [0049]
- DK76893 [0057]
- DK26594 [0057]
- 60 • DK26494 Novo Nordisk A/S [0057]
- DK99094 Novo Nordisk A/S [0070]
- 65 • US5156956 Motoki [0072]
- US5252469 Andou [0072][0072]

ES 2 289 824 T3

- EPO420358 [0078]
- US4106991 [0081]
- 5 • US4661452 [0081]
- GB1483591 [0081]
- EP238216 [0081]
- 10 • WO9206154 [0083]
- WO9219709 [0088]
- 15 • WO9219708 [0088]
- EP518719 [0101]
- EP518720 [0101]
- 20 • EP518721 [0101]
- EP516553 [0101]
- 25 • EP516554 [0101]
- EP516555 [0101]
- GB2200132 [0101]
- 30 • DE3741617 [0101]
- DE3727911 [0101]
- 35 • DE4212166 [0101]
- DE4137470 [0101]
- DE3833047 [0101]
- 40 • WO9317089 [0101]
- DE4205071 [0101]
- 45 • WO5209680 [0101]
- WO9318129 [0101]
- WO9309153 [0101]
- 50 • WO9206157 [0101]
- WO9208777 [0101]
- 55 • EP429124 [0101]
- WO9321299 [0101]
- US5141664 [0101]
- 60 • EP561452 [0101]
- EP561446 [0101]
- 65 • GB2234980 [0101]
- WO9303129 [0101]

ES 2 289 824 T3

- EP481547 [0101]
- EP530870 [0101]
- 5 • EP533239 [0101]
- EP554943 [0101]
- EP346137 [0101]
- 10 • US5112518 [0101]
- EP318204 [0101]
- 15 • EP318279 [0101]
- EP271155 [0101]
- EP271156 [0101]
- 20 • EP346136 [0101]
- GB222 [0101]
- 25 • GB8945 [0101]
- CA2006687 [0101]
- WO9325651 [0101]
- 30 • EP530635 [0101]
- EP414197 [0101]
- 35 • US5240632 [0101]
- WO9421785 Novo Nordisk A/S [0146]
- US5354681 [0148]
- 40 • DK107184 [0150]
- JP1110147 [0151]
- 45 • WO9322930 [0152]
- WO9421120 [0153]
- WO9421129 [0153]
- 50 • US3297548 [0156]
- EPO420358 [0157]
- 55 • JP03076529 [0158]
- J P06070749 [0159]
- WO9313256 [0161]
- 60 • WO9320278 [0164]
- WO9413839 [0167]
- 65 • WO9942566 [0209]
- DK9700037 [0209]

- EP531372 [0209]

Bibliografía aparte de patentes citada en la descripción

- **BABIKER** *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 1998, vol.46, 866-871 [0010]
- T. E. **CREIGHTON**, *Proteins - Structures and Molecular Properties*. W.H. Freeman and Co., 1993, 91-93 [0021]
- **WALSHET** *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 1989, vol.121, 1275-280 [0029]
- **SCHOOFS** *et al.*, *J. Immunol.*, 1987, vol. 140, 611-616 [0029]
- **KOHLMAN** *et al.*, *Protein Science*, 1999, vol.8 (Supl. 268) [0029]
- W. **KABSCH**; C. **SANDER**. *BIOPOLYMERS*, 1983, vol.22, 2577-2637 [0031]
- Biocatalysis. **REETZ** MT; **JARGER** KE. *Discovery to Application*, 1999, vol. 200, 31-57 [0033]
- **STEMMER**. *Nature*, 1994, vol. 370, 389-391 [0033]
- **ZHAO**; **ARNOLD**, *Proc. Natl. Acad. Sci.; USA*, 1997, vol. 94, 7997-8000 [0033]
- **YANO** *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1998, vol. 95, 5511-5515 [0033]
- J.E. **NESS** *et al.*, *Nature Biotechnology*, 1999, vol.17, 893-896 [0033]
- **THOMAS** *et al.*, *Nature*, 1985, vol. 318, 375-376 [0042]
- **THOMAS** *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 1987, vol. 193, 803-813 [0042]
- **RUSSEL** *et al.*, *Nature*, 1987, vol. 328, 496-500 [0042]
- *Methods of Enzymatic Analysis*. Verlag Chemie, 1984, vol. 5 [0043]
- **SCHIMADA** *et al.*, *J. Biochem.*, 1989, vol. 106, 383-388 [0046]
- **YAMAGUCHI** *et al.*, *Gene*, 1991, vol. 103, 61-67, [0046]
- **HASS** *et al.*, *Gene*, 1991, vol.109, 107-113 [0046]
- **KUGIMIYA** *et al.*, *Biosci. Biotech. Biochem*, 1992, vol. 56, 716-719 [0046]
- **DARTOIS** *et al.*, *Biochemica et Biophysica acta*, 1993, vol. 113, 153- 260 [0046]
- *Methods of Enzymatic Analysis*. Verlag Chemie, 1984, vol. 4 [0050] [0066]
- *Methods of Enzymatic Analysis*. Verlag Chemie, 1984, vol. 3 [0060]
- **KLEIN** *et al.*, *Journal of Bacteriology*, vol. 174, 2599-2605 [0072]
- **KAEMPFER** *et al.*, *Journal of General Microbiology*, vol. 137, 1831-1892 [0072]
- **OCHI** *et al.*, *International Journal of Sytematic Bacteriology*, vol. 44, 285-292 [0072]
- **WILLIAMS** *et al.*, *Journal of General Microbiology*, vol. 129, 1743-1813 [0072]
- *Methods of Enzymatic Analysis*. Verlag Chemie, 1984, vol. 1 [0074] [0078]
- R. L. **GOLDEMBERG**. *DCI*, Noviembre 1993, 48-52 [0114]
- **SAMBROOK** *et al.*, *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor lab., 1989 [0193]
- *Current protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, 1995 [0193]
- *Molecular Biological Methods for Bacillus*. John Wiley and Sons, 1990 [0193]
- **SAMBROOK** *et al.*, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor [0209]

- **FORD** *et al.*, *Protein Expression and Purification*, 1991, vol. 2, 95-107 [0209]
- **SVENDSEN** *et al.*, *Methods in Enzymology*, 1997, vol. 284, 317-340 [0209] [0211]
- 5 • **HALME** *et al.*, *J. Immunotherapy with Emphasis on Tumor Immunology*, 1994, vol. 15, 283-291 [0223]
- **VASIL'EVA** *et al.*, *Zhurnal Mikrobiologii. Epidemiologii I Imunobiologii*, Octobre 1991, vol. 10, 34-36 [0223]
- 10 • **ARMSTRONG LR; CHRISTENSEN PJ; PAINE R III et al.** *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1994, vol. 11, 682-691 [0223]
- **HOLT PG; OLIVER J; BILYLE B et al.**, *J Exp Med*, 1993, 397-407 [0223]
- 15 • *J. Immunotherapy with Emphasis on Tumor Immunology*, 1994, vol.15, 283-291 [0224]
- *Zhurnal Mikrobiologii. Epidemiologii I Imunobiologii*, Octobre 1991, vol. 10, 34-36 [0224]
- **J. CLAUSEN**. Immunochemical Techniques For The Identification And Estimation Of Macromolecules. *Elsevier*, 1988, 187-188 [0225]
- 20

25

30

35

40

45

50

55

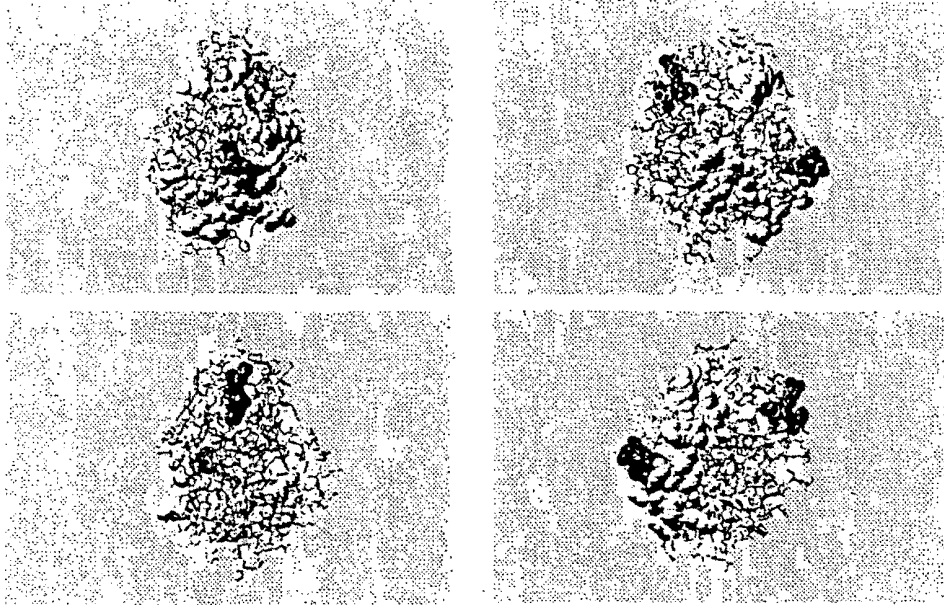
60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para producir una variante de una proteína N-glicosilada con una alergenicidad reducida medida como una producción de anticuerpos IgE reducida en animales, incluido el hombre, en comparación con la proteína progenitora, comprendiendo
- 10 la construcción de moléculas de ADN de codificación de variantes de proteínas, dichas moléculas de ADN teniendo al menos una subsecuencia que codifica un sitio de N-glicosilación adicional en comparación con la proteína progenitora,
- 15 la selección de una molécula de ADN de codificación de una variante de la proteína glicosilada, con una alergenicidad reducida de al menos un 50% en comparación con la proteína progenitora, la alergenicidad siendo medida como una producción de anticuerpos IgE reducida en ratas expuestas a la variante intratraqueal,
- 20 la introducción de la molécula de ADN de codificación de la variante en un huésped adecuado capaz de realizar la glicosilación,
- el cultivo de dicho huésped en un medio adecuado, en el cual se expresa dicha variante de proteína y se glicosila en el huésped,
- la recuperación de la variante de la proteína glicosilada del medio.
- 25 2. Método según la reivindicación 1, donde la alergenicidad, según está expresada por la respuesta de los anticuerpos IgE en ratas, de la variante de la proteína glicosilada es inferior al 1% de la proteína progenitora.
3. Método según las reivindicaciones 1-2, donde la molécula de ADN tiene al menos dos subsecuencias que codifican sitios de glicosilación adicionales.
- 30 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el(los) sitio(s) de glicosilación adicional(es) es(son) introducido(s) en una posición que afecta a los epítomos.
5. Método según la reivindicación 4, donde el(los) epítomo(s) es(son) identificado(s) mediante la selección de bibliotecas de presentación en fagos.
- 35 6. Método según la reivindicación 1, donde las variantes de la proteína son una biblioteca diversificada de variantes.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la proteína es una enzima.
- 40 8. Método según la reivindicación 7, donde la enzima es seleccionada de los grupos que consisten en proteasas, lipasas, fitasas, liasas polisacáridas, oxidoreductasas, transglutaminasas, hidrolasas de glicosilo, y glicosaisomerasas.
9. Método según la reivindicación 8, donde la enzima es una lipasa.
- 45 10. Método según la reivindicación 9, donde los sitios de glicosilación adicionales son elegidos a partir de N33, N37, N163 y/o N212 de la secuencia para la lipasa de *Humicola lanuginosa* o de los sitios correspondientes en las lipasas homólogas.
- 50
- 55
- 60
- 65

Variante #1



Variante #5

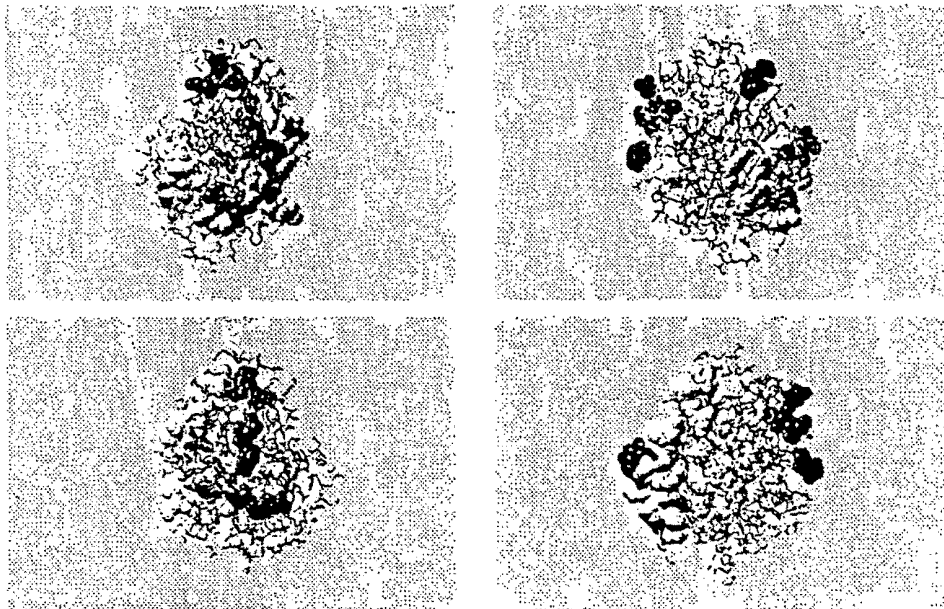


Fig. 1

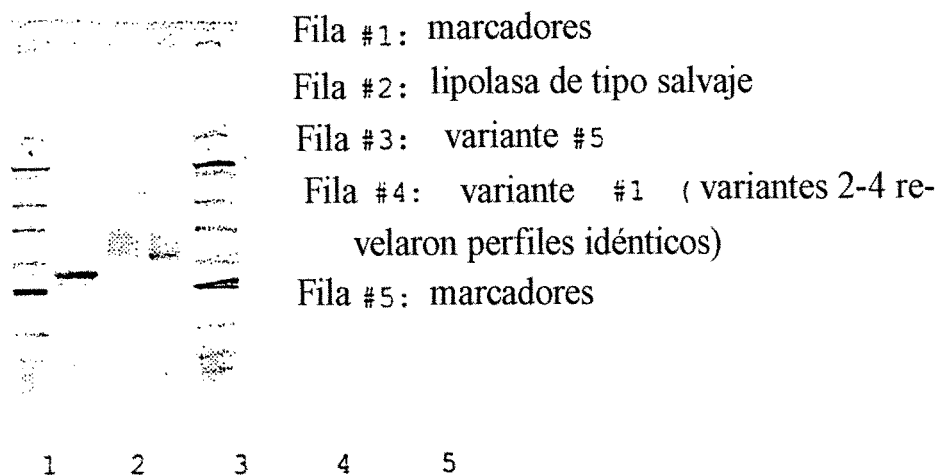


Fig. 2

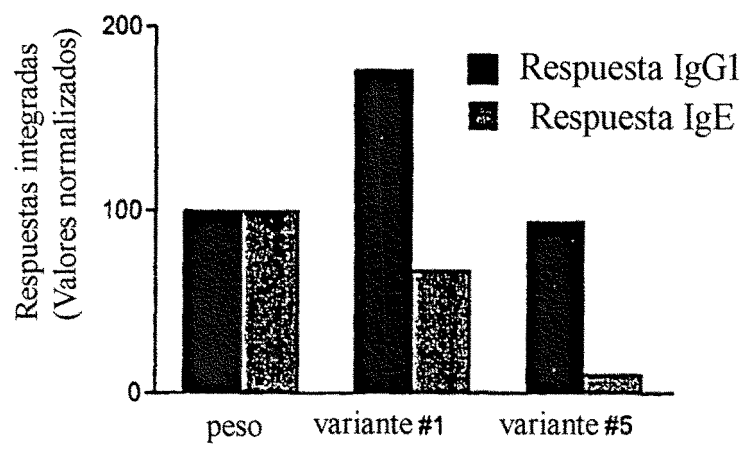


Fig. 3

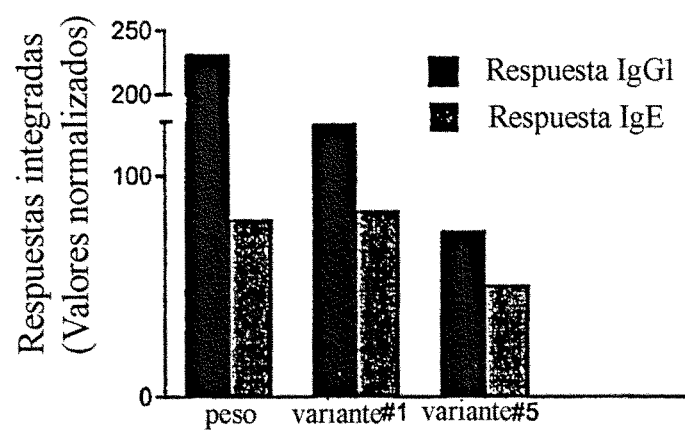


Fig. 4