



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 171 136**

② Número de solicitud: 200002897

⑤ Int. Cl.<sup>7</sup>: C12N 9/58

C12N 15/57

C12N 15/63

A01H 5/00

A01N 63/00

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **01.12.2000**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.08.2002**

Fecha de concesión: **17.09.2003**

⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **16.10.2003**

④ Fecha de publicación del folleto de patente:  
**16.10.2003**

⑦ Titular/es: **NEWBIOTECHNIC, S.A.**  
**Avda. Américo Vespucio, 69**  
**41092 Sevilla, ES**  
**UNIVERSIDAD DE SEVILLA y**  
**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

⑦ Inventor/es: **Suárez Fernández, Belén;**  
**Rey Barrera, Manuel;**  
**Monte Vázquez, Enrique y**  
**Llobell González, Antonio**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Enzima con actividad proteolítica, construcción de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica dicha enzima y sus aplicaciones.**

⑤ Resumen:

Enzima con actividad proteolítica, construcción de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica dicha enzima y sus aplicaciones.

Enzima con actividad proteolítica, plácido y perteneciente a las serin-peptidasas. La enzima tiene, además, afinidad por estructuras que comprenden proteínas o péptidos, y por estructuras compuestas por polisacáridos covalentemente unidos a proteínas, y es útil en la degradación o modificación de dichas estructuras. La enzima puede utilizarse en la inactivación proteolítica irreversible de proteínas estructurales o con actividad enzimática determinantes de la virulencia o patogénesis de patógenos sobre animales o plantas. La construcción de ADN comprende una secuencia de ADN que codifica dicha enzima y resulta útil para la generación de vectores, células y plantas transgénicas que expresan dicha actividad proteolítica con propiedades mejoradas de resistencia a patógenos mediante la inactivación irreversible de enzimas y proteínas responsables del ataque a la planta.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 - 28036 Madrid

ES 2 171 136 B1

## DESCRIPCION

Enzima con actividad proteolítica, construcción de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica dicha enzima y sus aplicaciones.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a enzimas con actividad proteolítica, a construcciones de ADN que codifican dichas enzimas, a métodos para la producción de dichas enzimas, a composiciones que comprenden dichas enzimas y al empleo de dichas enzimas, construcciones de ADN y composiciones.

10 **Antecedentes de la invención**

Las enzimas con actividad proteolítica, conocidas como proteasas, peptidasas o péptido-hidrolasas, son enzimas capaces de catalizar la hidrólisis de un enlace peptídico (E.C. 3.4). Este grupo de enzimas se caracteriza por su distribución ubicua en las distintas formas de vida, su variabilidad en la localización celular y por la gran variedad de procesos fisiológicos en los que intervienen.

Atendiendo a su modo de acción las peptidasas se clasifican en exopeptidasas [peptidasas que requieren la presencia de un extremo amino o carboxilo libre en el sustrato], y endopeptidasas [peptidasas que hidrolizan enlaces peptídicos presentes dentro de la cadena]. Los distintos mecanismos catalíticos reconocidos de estas enzimas han dado lugar a cuatro subgrupos denominados según el sitio activo que interviene directamente en la ruptura del enlace peptídico [aspartil-endopeptidasas, cistein-endo-peptidasas, metalo-endopeptidasas y serin-endopeptidasas]. Una revisión de la clasificación y características de estas enzimas puede encontrarse en los trabajos de Rawlings y Barret [Rawlings N.D. & Barrett A.J. (1994). Families of serine peptidases. *Methods in Enzymology*, 244:19-61; Rawlings N.D. & Barrett A.J. (1994). Families of cysteine peptidases. *Methods in Enzymology*, 244:461-486; Rawlings N.D. & Barrett A.J. (1995). Families of aspartic peptidases, and those of unknown catalytic mechanism. *Methods in Enzymology*, 248:105-120; Rawlings N.D. & Barrett A.J. (1995). Evolutionary families of metallopeptidases. *Methods in Enzymology*, 248:183-228)]. Las peptidasas pueden ser ácidas, básicas o neutras dependiendo de su actividad a pH bajo, alto o neutro, respectivamente.

Las peptidasas se utilizan ampliamente en diversas industrias, por ejemplo, en la fabricación de detergentes para el lavado de la ropa, en la industria del cuero, en la industria alimentaria, etc.

Aunque los hongos del género *Trichoderma* se llevan estudiando desde hace mucho tiempo (tanto por su actividad celulolítica como por sus propiedades antagonistas de los patógenos fúngicos de las plantas) y se han identificado numerosas enzimas (quitinasas,  $\beta$ -1,3- y  $\beta$ -1,6-glucanasas,  $\alpha$ -1,3-glucanasas, etc.), tan solo se han identificado y caracterizado dos proteasas, una aspartil-proteasa de *T. reesei* y una serin-proteasa de *T. harzianum*. Esta última, denominada Prb1 (Geremia, R.A., Goldman, G.H., Jacobs, D., Ardiles, W., Vila, S. B., van Motagu, M. and Herrera-Estrella, A. (1993). Molecular characterization of the proteinase-encoding gene, prb1, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. *Molecular Microbiology* 83: 603-613), se ha relacionado con el micoparasitismo, tiene un peso molecular de 31 kDa, un punto isoeléctrico (pI) básico y pertenece a la familia de las subtilisinas.

Aunque se han descrito numerosas enzimas con actividad proteolítica, su importancia en la industria junto con la enorme variedad existente en cuanto a los mecanismos de acción, afinidad a sustrato, especificidad, capacidad lítica, etc., justifican la necesidad de incrementar el arsenal de enzimas con capacidad proteolítica.

50 **Compendio de la invención**

La invención se enfrenta con el problema de proporcionar nuevas enzimas con actividad proteolítica.

La solución proporcionada por esta invención se basa en que los inventores han encontrado una nueva enzima con actividad proteolítica, que tiene un pI ácido y pertenece a la familia de las serin-peptidasas. Una característica que presenta dicha enzima, además de su actividad proteolítica que le permite degradar enlaces peptídicos, es su afinidad por estructuras que comprenden proteínas o péptidos, tales como las paredes celulares de los hongos (que contienen quitina y polímeros de glucano embebidos en, y covalentemente unidos a, una matriz proteica), o estructuras compuestas por polisacáridos covalentemente unidos a proteínas, por ejemplo, cutículas de insectos, arácnidos, etc., por lo que dicha enzima puede intervenir en la degradación o modificación de dichas estructuras que comprenden proteínas o péptidos. Además, la enzima proporcionada por la invención también puede ser utilizada en la inactivación pro-

teolítica irreversible de proteínas estructurales o con actividad enzimática determinantes de la virulencia o patogénesis de patógenos sobre animales o plantas.

Por tanto, un objeto de esta invención lo constituye una enzima con actividad proteolítica. El procedimiento para la obtención de dicha enzima y composiciones que comprenden dicha enzima también constituyen objetos adicionales de esta invención.

Objetos adicionales de esta invención lo constituyen el empleo de dichas enzimas o composiciones para la degradación o modificación de materiales que contienen enlaces peptídicos, incluyendo estructuras que comprenden proteínas o péptidos, así como en la inactivación proteolítica irreversible de proteínas estructurales o con actividad enzimática determinantes de la virulencia o patogénesis de patógenos sobre animales o plantas.

Otro objeto adicional de esta invención lo constituye el aislamiento y caracterización de secuencias de ADN que codifican dicha enzima y la clonación de dichas secuencias de ADN. Los vectores, células y plantas transgénicas que comprenden dichas secuencias de ADN constituyen otro objeto adicional de esta invención. El empleo de dichas secuencias de ADN para la obtención de dichas enzimas o para la construcción de plantas transgénicas también constituye un objeto adicional de esta invención.

## 20 Descripción detallada de la invención

La invención proporciona una enzima con actividad proteolítica, en adelante enzima de la invención, que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

- 25 a) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. ID. N°: 1, y
- b) una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga y funcionalmente equivalente a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. ID. N°: 1.

30 En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “sustancialmente homóloga” significa que las secuencias de aminoácidos en cuestión tienen un grado de identidad, a nivel de aminoácidos, de, al menos, un 70 %, preferentemente de, al menos, un 85 %, y, más preferentemente de, al menos, un 95 %.

35 Asimismo, en el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “funcionalmente equivalente” significa que la proteína en cuestión tiene, al menos, actividad proteolítica.

La enzima de la invención, además de su actividad proteolítica, que puede ensayarse tanto en gel, mediante el ensayo caseína-SDS-PAGE [Ejemplo 1.2], como en fase líquida [apartado A del Ejemplo 3.3], puede tener afinidad por estructuras que comprenden proteínas o péptidos, por ejemplo, las paredes celulares de los hongos, las cutículas de insectos y arácnidos, etc., y/o la capacidad de inactivar irreversiblemente, mediante proteólisis, proteínas estructurales o con actividad enzimática implicadas en el ataque de un patógeno sobre animales o plantas. La afinidad de la enzima de la invención por estructuras que comprenden proteínas o péptidos puede ensayarse mediante un procedimiento de adsorción-digestión con paredes celulares purificadas de un hongo, por ejemplo, *C. acutatum* o *Botrytis cinerea*, tal como el descrito en el Ejemplo 1.3 donde se ilustra un ensayo para determinar la adsorción de proteínas a paredes celulares fúngicas.

50 En una realización particular, la enzima de la invención tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. ID. N°: 1 o un fragmento activo de la misma, es decir, un fragmento de dicha proteína que mantiene la actividad proteolítica.

55 En otra realización particular, la enzima de la invención es una enzima, o fragmento activo, derivada de *T. harzianum*, que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. ID. N°: 1, o una parte de la misma. En una realización concreta, la enzima de la invención es una enzima derivada de *T. harzianum* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. ID. N°: 1 y ha sido denominada Pra1 en esta descripción [Ejemplos 1 y 2].

60 La enzima Pra1 tiene un peso molecular de 28 kDa determinado por SDS-PAGE, un pI de 4,7-4,9, un pH óptimo de 7,5 (aunque es más estable a un pH ácido), una temperatura óptima comprendida entre 35°C y 40°C (pH 7,5), pertenece a la familia de las serin-peptidasas, es una peptidasa de tipo tripsina ya que presenta las secuencias del extremo amino y de un péptido interno presenta una elevada homología con otras proteasas de tipo tripsina, tiene especificidad por N-acetil-Ile-Glu-Ala -Arg-pNA (un sustrato

sintético específico para tripsina) pero no tiene actividad frente a otros sustratos sintéticos para quimo-tripsina o elastasa [Ejemplo 3].

La enzima de la invención puede obtenerse a partir de un organismo productor de la misma, tal como un hongo del género *Trichoderma*, mediante un procedimiento que comprende el cultivo del organismo productor bajo condiciones apropiadas para la expresión de dicha enzima y, posteriormente, recuperar dicha enzima. En una realización particular de esta invención, el hongo utilizado pertenece a la especie *Trichoderma harzianum*, concretamente a la cepa depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de acceso CECT 2413.

El cultivo del organismo productor puede hacerse en dos etapas, tal como se menciona en el Ejemplo 1. En una primera etapa se inoculan esporas del hongo en un medio de cultivo suplementado con glucosa como fuente de carbono y, a continuación, se recoge el micelio, se lava y se cultiva en medio mínimo adecuado suplementado con paredes celulares fúngicas purificadas, por ejemplo, de *Colletotrichum acutatum*, como única fuente de carbono para inducir enzimas con actividad proteolítica.

El aislamiento y purificación de la enzima de la invención se puede llevar a cabo mediante técnicas convencionales que comprenden la separación de las proteínas producidas mediante cromatografía y la filtración en gel de las fracciones concentradas que presentaron mayor actividad proteolítica [véase el Ejemplo 2]. La enzima con actividad proteolítica purificada se puede utilizar para su caracterización (Ejemplo 3).

A partir de la enzima de la invención se puede identificar y aislar la secuencia de ADN que codifica para dicha enzima mediante un procedimiento que comprende:

- la creación de genotecas de ADN genómico (ADNg) o de ADN copia (ADNc) de organismos productores de la enzima de la invención;
- la secuenciación del extremo amino de la enzima de la invención y de fragmentos trípticos de la misma;
- el diseño de oligonucleótidos adecuados para amplificar, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), una región del clon genómico de los organismos productores de la enzima de la invención que sirva para obtener sondas destinadas a escrutar dichas genotecas; y
- el análisis y selección de los clones positivos.

Todas estas etapas se describen con más detalle en el Ejemplo 4 donde se ilustra la obtención de una secuencia de ADN que codifica la proteasa Pra1 de *T. harzianum*.

La genoteca de ADNc puede obtenerse a partir del ARN total del organismo productor de la enzima de la invención siguiendo un protocolo estándar [Chomczynski y Sacchi, 1987, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162:156-159] con ligeras modificaciones. En una realización particular, el organismo productor de la enzima de la invención es *T. harzianum* CECT 2413, que se cultiva en un medio mínimo con paredes celulares fúngicas como única fuente de carbono, aislándose el ARN mensajero (ARNm) mediante cromatografía de afinidad a oligo(dT)celulosa. Posteriormente, se sintetiza el ADNc, por ejemplo, utilizando un kit comercial, se liga a un vector adecuado y se empaqueta en un hospedador apropiado.

La secuenciación del extremo amino de la enzima de la invención y de fragmentos internos de la misma se puede realizar mediante cualquier procedimiento convencional, por ejemplo, mediante el método de Edmans Matsudaira [A practical guide to protein and peptide purification for microsequencing. Academic press, Inc. New York, Edmans Matsudaira (eds.) 1989].

A partir de la información obtenida de la secuencia del extremo amino y de los fragmentos internos de la enzima de la invención se puede diseñar un conjunto de oligonucleótidos destinados a amplificar una secuencia específica correspondiente a la secuencia de ADN que codifica la enzima de la invención. En una realización particular, el oligonucleótido directo se diseñó a partir de la secuencia del extremo amino de la enzima Pra1 mientras que el oligonucleótido inverso (antisentido) se diseñó a partir de la secuencia del fragmento interno de la enzima Pra1. En el Ejemplo 3 se describen las secuencias del extremo amino y de un fragmento interno de la enzima Pra1 que sirvieron para diseñar los oligonucleótidos utilizados para la realización de la PCR.

## ES 2 171 136 B1

Los fragmentos adecuados resultantes de la amplificación mediante PCR se pueden marcar y utilizar como sondas para escrutar una genoteca (de ADNg o de ADNc) con el fin de aislar los clones de interés mediante hibridación *in situ*.

Por tanto, la invención proporciona una construcción de ADN que codifica para la enzima de la invención que comprende:

- a) una secuencia de ADN que comprende la SEC. ID. N°: 2; o
- b) una secuencia de ADN análoga a la secuencia definida en a) que
  - i) es sustancialmente homóloga a la secuencia de ADN definida en a); y/o
  - ii) codifica para un polipéptido que es sustancialmente homólogo a la proteína codificada por la secuencia de ADN definida en a).

En el sentido utilizado en esta descripción, el término “análogo/a” pretende incluir a cualquier secuencia de ADN que codifica para una enzima con actividad proteolítica que tiene las propiedades i)-ii) arriba mencionadas. Típicamente, la secuencia de ADN análoga:

- se puede aislar de cualquier organismo que produce la enzima con actividad proteolítica en base a la secuencia de ADN mostrada en la SEC. ID. N°: 2, o

- se construye en base a la secuencia de ADN mostrada en la SEC. ID. N°: 2, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos conservativas, es decir, que no dan lugar a otra secuencia de aminoácidos de la proteasa codificada por dicha secuencia de ADN mostrada en la SEC. ID. N°: 2, pero que corresponde al empleo de codones del organismo hospedador destinado a la producción de la enzima, o bien mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos que dan lugar a una secuencia de aminoácidos diferente y, por tanto, posiblemente, a una estructura proteica diferente que pudiera dar lugar a una proteasa mutante con propiedades diferentes a las de la enzima nativa. Otros ejemplos de posibles modificaciones incluyen la inserción de uno o más nucleótidos en la secuencia, la adición de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos de la secuencia, o la delección de uno o más nucleótidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia. Por ejemplo, la secuencia de ADN análogo puede ser una subsecuencia de la secuencia de ADN mostrada en cualquiera de las secuencias mostradas en la SEC. ID. N°: 2.

En general, la secuencia de ADN análoga es sustancialmente homóloga a la secuencia de ADN que codifica para una enzima con actividad proteolítica de la invención, por ejemplo SEC. ID. N°: 2, es decir, presenta una homología a nivel de nucleótidos de, al menos, un 70 %, preferentemente, al menos un 85 %, o más preferentemente, al menos, un 95 % respecto a cualquiera de las secuencias mencionadas previamente.

En una realización particular, la secuencia de ADN proporcionada por esta invención tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC. ID. N°: 2, o un fragmento de la misma que codifica una proteína que mantiene la actividad proteolítica.

En otra realización particular, la secuencia de ADN proporcionada por esta invención, o fragmento que codifica una proteína que mantiene la actividad proteolítica, procede de *T. harzianum* y comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC. ID. N°: 2, o una parte de la misma. En una realización preferida, dicha secuencia de ADN deriva de *T. harzianum*, tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC. ID. N°: 2 y codifica la proteasa Pra1 de *T. harzianum*.

La secuencia de ADN que codifica la enzima de la invención puede proceder no solo de *T. harzianum* sino de cualquier otra cepa de *Trichoderma* o de cualquier organismo hospedador transformado con dicha secuencia de ADN.

Alternativamente, la secuencia de ADN que codifica para la enzima de la invención, puede ser aislada, mediante técnicas convencionales, a partir del ADN de cualquier organismo mediante el empleo de sondas o de oligonucleótidos preparados a partir de la información sobre la secuencia de ADN proporcionada en esta descripción, o mediante iniciadores (por PCR).

La secuencia de ADN que codifica para la enzima de la invención, o la construcción que la contiene, puede ser insertada en un vector apropiado. Por tanto, la invención también se refiere a un vector, tal como un vector de expresión, que comprende dicha secuencia de ADN, o una construcción que la contiene. La elección del vector dependerá de la célula hospedadora en la que se va a introducir posteriormente.

5 A modo de ejemplo, el vector donde se introduce dicha secuencia de ADN puede ser un plásmido o un vector que, cuando se introduce en una célula hospedadora, se integra en el genoma de dicha células y se replica junto con el cromosoma (o cromosomas) en el que (en los que) se ha integrado.

En el vector proporcionado por esta invención, la secuencia de ADN que codifica para la enzima de la invención debe estar conectada operativamente a un promotor y a una secuencia terminadora. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestra una actividad transcripcional en la célula hospedadora elegida y puede derivar bien de genes que codifican para proteínas homólogas o heterólogas de la célula hospedadora. Los procedimientos utilizados para ligar la secuencia de ADN que codifica para la enzima de la invención al promotor y a la secuencia terminadora, respectivamente, y para insertar dicha construcción en un vector son bien conocidos por los técnicos en la materia y han sido descritos, por ejemplo, por Sambrook et al. [Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY, 1989].

10  
15

La invención también proporciona una célula que comprende una secuencia de ADN que codifica la enzima de la invención, o una construcción de ADN que contiene a dicha secuencia o dicho vector mencionado más arriba. Las células hospedadoras que se pueden transformar con la secuencia de ADN que codifica la enzima de la invención pueden ser células procarióticas o, preferentemente, células eucarióticas, tales como células de tejidos vegetales o células fúngicas, por ejemplo, células de levadura o de hongos filamentosos. La transformación de estas células puede llevarse a cabo mediante técnicas convencionales, por ejemplo, mediante técnicas que implican la formación de protoplastos y la transformación de los mismos seguido de la regeneración de la pared celular. La transformación de células de tejidos vegetales puede ser muy interesante desde diversos puntos de vista, por ejemplo, para aumentar la resistencia a hongos fitopatógenos.

20  
25

Debido a que la enzima de la invención, opcionalmente, tiene la capacidad de inactivar irreversiblemente, mediante proteólisis, proteínas estructurales o con actividad enzimática implicadas en el ataque de patógenos a animales o plantas y/o determinantes de la virulencia o patogénesis de patógenos sobre animales o plantas, la construcción de ADN proporcionada por esta invención, que codifica la enzima de la invención, se puede utilizar para reducir la virulencia o patogénesis de patógenos de animales y plantas, o para aumentar la resistencia de animales y plantas a patógenos, por ejemplo, para aumentar la resistencia de plantas frente a hongos del género *Botrytis* mediante la inactivación de la(s) proteína(s) estructural(es) o enzima(s) implicadas en el ataque del patógeno a la planta. Por consiguiente, en una realización particular, la construcción de ADN proporcionada por esta invención se utiliza en la obtención de plantas transgénicas capaces de expresar la enzima de la invención para mejorar la resistencia a patógenos mediante la inactivación irreversible de enzimas y proteínas responsables del ataque a la planta. Para la obtención de estas plantas transgénicas se puede proceder con las técnicas convencionales de ARNm antisentido y/o sobreexpresión (silenciamiento en sentido), u otras, por ejemplo, utilizando vectores binarios u otros vectores disponibles para las diferentes técnicas de transformación de plantas existentes en la actualidad.

30  
35  
40

Por tanto, la invención también proporciona una célula transgénica de una planta que comprende una construcción de ADN de la invención que tiene un promotor, funcional en dicha planta, operativamente enlazado a una construcción de ADN de la invención, o a un fragmento de la misma.

45

Una planta transgénica que comprende, al menos, una de dichas células transgénicas, constituye un objeto adicional de esta invención. En una realización particular, dicha planta transgénica es una planta de fresa.

50

La invención también proporciona un método para la producción de una enzima de la invención, que comprende cultivar una célula hospedadora adecuada que contiene la secuencia de ADN que codifica la enzima de la invención bajo condiciones que permiten la producción de la enzima y recuperar la enzima del medio de cultivo.

55

El medio utilizado para cultivar las células hospedadoras transformadas puede ser cualquier medio adecuado para cultivar las células hospedadoras en cuestión. La peptidasa expresada puede ser, ventajosamente, secretada al medio de cultivo y puede ser recuperada mediante un procedimiento como el descrito en el Ejemplo 2 o por cualquier otro procedimiento convencional de aislamiento de proteínas

60

que comprende la separación de las células del medio de cultivo, la precipitación de las proteínas y la separación por métodos cromatográficos.

5 La invención también proporciona una preparación enzimática que comprende, al menos, una enzima con actividad proteolítica de la invención. Esta preparación enzimática es útil para la degradación o modificación de materiales que contienen enlaces peptídicos, es decir, materiales que contienen proteínas, péptidos o restos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, tales como paredes celulares de organismos procariontas o eucariotas, por ejemplo, paredes celulares de hongos, ya que dichas paredes celulares contienen quitina y/o polímeros de glucano embebidos en, y covalentemente unidos a, una matriz proteica, o cutículas de insectos o arácnidos que comprenden estructuras a base de polisacáridos unidos  
10 covalentemente a proteínas.

La preparación enzimática proporcionada por esta invención puede contener entre 0,01 % y 100 % en peso de la enzima con actividad proteolítica de la invención.

15 En una realización particular, la preparación enzimática proporcionada por esta invención es una preparación enzimática de componente único y contiene mayoritariamente una enzima con actividad proteolítica de la invención.

20 En otra realización particular, la preparación enzimática proporcionada por esta invención comprende múltiples actividades enzimáticas, por ejemplo, diferentes actividades enzimáticas requeridas para la modificación o degradación de paredes celulares microbianas. A modo de ejemplo, dicha preparación enzimática puede incluir enzimas líticas, en particular de origen microbiano (fúngico o bacteriano), por ejemplo, derivadas de diversas especies de los géneros *Trichoderma*, *Oerskovia*, *Arthrobacter*, *Rhizotocnia*, *Staphylococcus* o *Streptomyces*. También puede contener una o más enzimas capaces de modificar o degradar paredes celulares, por ejemplo, enzimas con actividad celulolítica, mananolítica, quitinolítica o proteolítica, tales como celulasas,  $\beta$ -(1,6)-glucanasas,  $\beta$ -(1,3)-glucanasas, mananasas, endo- o exo-quitinasas, quitosanasas, proteasas,  $\alpha$ - o  $\beta$ -manosidasas, mutanasas, etc. Estas enzimas pueden proceder de cualquier organismo productor de las mismas, tales como diversas especies del género *Aspergillus* o los mencionados más arriba en relación con las enzimas líticas.

30 La preparación enzimática de la invención puede prepararse por métodos convencionales y puede presentarse en forma líquida o sólida, por ejemplo, en forma de un granulado. La preparación enzimática puede contener aditivos, por ejemplo, estabilizantes que prolonguen la estabilidad de la misma.

35 La enzima con actividad proteolítica proporcionada por esta invención también puede tener afinidad por paredes celulares fúngicas, o por cutículas de insectos y arácnidos, por lo que puede coadyuvar en la degradación de paredes celulares de hongos, por ejemplo, hongos fitopatógenos, tales como *C. acutatum*, *B. cinerea*, etc., o en la degradación de cutículas de insectos, arácnidos, etc.

40 Por tanto, la invención también proporciona una composición antifúngica que comprende, al menos, una enzima de la invención junto con, al menos, un fungicida, por ejemplo, un fungicida químico. Como fungicida químico puede utilizarse cualquiera de los usados habitualmente, preferentemente, un fungicida químico seleccionado del grupo formado por los fungicidas químicos que afectan a la membrana, los fungicidas químicos que afectan a la síntesis de la pared celular y sus mezclas. Opcionalmente, la composición antifúngica de la invención puede contener, además, al menos, una proteína con actividad enzimática degradadora de la pared celular. Cualquier enzima con actividad degradadora de paredes celulares puede utilizarse, si se desea, en la composición antifúngica de la invención.

45 La composición antifúngica de la invención, que puede contener entre 0,01 % y 99,99 % en peso de la enzima de la invención, puede prepararse por métodos convencionales y puede presentarse en forma líquida o sólida, por ejemplo, en forma de un granulado. La composición antifúngica de la invención también puede contener aditivos, por ejemplo, estabilizantes con el fin de prolongar la estabilidad de la misma.

50 Puesto que la enzima de la invención puede ser utilizada para degradar o modificar materiales que contienen enlaces peptídicos, por ejemplo, las proteínas presentes en las paredes celulares microbianas, la enzima de la invención puede ser utilizada como biofungicida frente a diversos organismos perniciosos, por ejemplo, frente a hongos fitopatógenos (incluyendo los hongos que causen daños en cultivos y los hongos contaminantes de frutos pre- y post-cosecha), hongos patógenos de animales (incluyendo hongos patógenos de humanos), hongos contaminantes de alimentos, superficies y equipamientos, y, en general, cualquier hongo que provoque pérdidas económicas en cualquier sector industrial, agrícola o ganadero.

60 La enzima de la invención también puede utilizarse para romper o lisar las paredes celulares de diver-

5        sos microorganismos para recuperar productos de interés producidos por dichos microorganismos.

      La preparación enzimática de la invención puede diseñarse a voluntad con una composición específicamente adaptada para la pared celular a romper o lisar. Por ejemplo, si la pared celular a romper  
5        contiene un complejo proteína-manano y un glucano, la preparación enzimática podría contener, ventajosamente, una mezcla de actividades proteasa, mananasa, quitinasa y  $\beta$ -glucanasa, con el fin de romper de forma eficiente dicha pared celular.

10        Otras aplicaciones de la enzima de la invención incluyen, a modo ilustrativo, no limitativo, la extracción de mano -proteínas de la capa externa de las paredes celulares de levadura; la producción de protoplastos a partir de levaduras u hongos; la preparación de extractos de levaduras y hongos; la mejora de las operaciones de filtración en procesos para la producción de vinos, mostos y zumos; la elaboración de vinos con propiedades organolépticas alteradas mediante la sobreexpresión del gen en las levaduras  
15        vínicas; la elaboración de composiciones para la limpieza de dientes y dentaduras; la elaboración de composiciones para la limpieza de lentes de contacto; la eliminación de hongos sobre recubrimientos; el tratamiento de tejidos, por ejemplo, la retirada del exceso de colorante en los tejidos; la elaboración de composiciones para retirar la placa dental; la elaboración de composiciones para retirar películas biológicas (biofilms) depositadas en superficies, por ejemplo en la superficie de una lente de contacto; la fabricación de detergentes para el lavado de la ropa y/o la vajilla, etc.

20        La enzima o la preparación enzimática o la composición antifúngica proporcionadas por esta invención pueden utilizarse en el control de organismos perniciosos, por ejemplo, frente a hongos fitopatógenos (incluyendo los hongos que causen daños en cultivos y los hongos contaminantes de frutos pre- y post-cosecha), hongos patógenos de animales (incluyendo hongos patógenos de humanos), hongos contaminantes de alimentos, superficies y equipamientos, y, en general, cualquier hongo que provoque pérdidas  
25        económicas en cualquier sector industrial, agrícola o ganadero. En el sentido utilizado en esta descripción, el término "controlar" incluye la reducción o paralización del crecimiento y/o de la germinación que puede resultar en la eliminación de dichos organismos perniciosos o en la disminución de los daños causados por éstos. Por tanto, en una realización particular de esta invención dichas preparaciones enzimáticas o composiciones antifúngicas serán composiciones farmacéuticas o composiciones para su aplicación en el  
30        sector agrario.

      La enzima, preparación enzimática o composición antifúngica de la invención también puede ser utilizada para desinfectar, prevenir y/o tratar la infección causada por hongos patógenos de animales en instalaciones ganaderas, las cuales son susceptibles de estar infestadas por hongos patógenos de animales  
35        que crecen y se desarrollan en sustratos que están en contacto con los animales, por ejemplo, la paja utilizada en las camas de los animales, o en las condiciones de estabulación de los animales, con lo que existe el riesgo de que dichos animales sean infestados por tales patógenos.

      Por otra parte, como es bien conocido, en ocasiones, las muestras de ensayos para análisis, por ejemplo,  
40        muestras biológicas, de alimentos, etc., presentan contaminaciones por hongos que dificultan o impiden el análisis de dichas muestras. La invención proporciona una solución a dicho problema que consiste en el empleo de una enzima, preparación enzimática o composición antifúngica de la invención para controlar la contaminación fúngica en dichas muestras de ensayo para análisis, mediante su aplicación a dichas  
45        muestras.

      La composición antifúngica de la invención puede ser usada para controlar todo tipo de hongos perniciosos, tales como los mencionados previamente, mediante el mecanismo de lucha conocido como control  
50        integrado.

      La dosificación de la preparación enzimática y de la composición antifúngica proporcionadas por esta invención y sus condiciones de uso pueden ser determinados en base a los métodos conocidos en la técnica.

      Otras aplicaciones de la enzima de la invención incluyen su empleo para combatir la patogénesis debida a insectos, arácnidos, etc., mediante la destrucción o modificación de su cutícula, así como su empleo para reducir la virulencia o patogénesis de patógenos de animales o plantas mediante la inactivación proteolítica irreversible de proteínas estructurales y/o enzimas implicadas en el ataque de dichos patógenos  
55        sobre animales y plantas.

      Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la presente invención y no deben ser considerados como limitativos del alcance de la misma.  
60



## Ejemplo 1

*Producción de enzimas con actividad proteolítica por T. harzianum CECT 2413 en cultivo líquido con afinidad por paredes celulares fúngicas*

5 1.1 *Condiciones de cultivo de T. harzianum*

Se realizaron pre-cultivos de *T. harzianum* CECT 2413 en matraces Erlenmeyer de 500 mL conteniendo 200 ml de medio mínimo para *Trichoderma* (MM) (15 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 ml metales traza (FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,5 g, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0,16 g, ZnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0,14 g, CoCl<sub>2</sub> 0,37 g, H<sub>2</sub>O destilada en cantidad suficiente para (c.s.p.) 100 ml), glucosa al 2% como fuente de carbono. El pH del medio se ajustó a pH 5,5 con KOH 10 M y se añadió agua destilada en c.s.p. 973,5 ml. Una vez esterilizado el medio se añadieron 20 ml de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (250 mg/mL), 4,1 ml de CaCl<sub>2</sub> 1 M y 2,4 ml de MgSO<sub>4</sub> 1 M. Los matraces se inocularon con una concentración final de 10<sup>6</sup> esporas/ml, y se incubaron a 200 rpm a 25°C durante 48 horas. A continuación, los micelios se recogieron, en condiciones de esterilidad, por filtración en kitasato a través de papel de filtro, se lavaron abundantemente con solución de MgCl<sub>2</sub> al 2% (w/v) y con agua estéril, e inmediatamente se utilizaron para inocular nuevos cultivos.

1.2 *Ensayo de la actividad proteolítica en geles de poliacrilamida: caseína-SDS-PAGE*

La detección de actividad proteolítica en los sobrenadantes de cultivo de *T. harzianum* se llevó a cabo después de someter las muestras a SDS-PAGE con el sustrato copolimerizado en el gel. Para ello, la preparación de los geles se realizó normalmente pero incluyendo en el gel de separación el sustrato caseína, concretamente 600 µl de tampón de renaturalización [Tris/HCl 50 mM pH 8,0, caseína (Sigma) 1% (p/v), ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) 2 mM y azida sódica 0,05% (p/v)]. Las muestras a ensayar se prepararon en tampón de carga conteniendo el agente desnaturante dodecilsulfato sódico (SDS) pero no el agente reductor 2-mercaptoetanol [Tris/HCl 0,25 M pH 6,8; glicerol al 40%; SDS al 8% y azul de bromofenol al 0,05%]. La electroforesis se realizó a 4°C para reducir la actividad enzimática durante la carrera. Posteriormente, el gel se incubó en tampón de renaturalización a temperatura ambiente en agitación durante 1 hora, con dos cambios del tampón. Este paso tiene la finalidad de eliminar el SDS contenido en el gel y permitir la renaturalización de las enzimas. Seguidamente, el gel se incubó a 37°C en tampón acetato sódico 50 mM durante 6 horas para permitir la actuación de las proteasas. Después de teñir y desteñir los geles la actividad proteolítica es visualizada como una zona no teñida sobre fondo azul oscuro.

35 1.3 *Ensayo de adsorción de proteínas a paredes celulares fúngicas*

La afinidad sobre paredes celulares fúngicas de enzimas con actividad proteolítica secretadas por *T. harzianum* CECT 2413 se ensayó siguiendo un método de adsorción-digestión convencional. Para ello, alícuotas de 2 ml de los sobrenadantes de cultivo de *T. harzianum*, concentrados y dializados, se incubaron en agitación a 4°C durante 20 minutos con un volumen igual de una suspensión al 1% (p/v) de paredes celulares fúngicas purificadas. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12.000 rpm en una centrífuga Sorvall modelo RC5-C con rotor SS34 durante 10 minutos. Los sobrenadantes recogidos se volvieron a incubar con nuevas suspensiones de paredes celulares dos veces más. Finalmente se reunieron las paredes celulares y se lavaron tres veces con 5 ml de tampón fosfato potásico 70 mM pH 6,0 suplementado con NaCl 1 M. Las proteínas no adsorbidas a las paredes celulares (que permanecieron en los sobrenadantes) se precipitaron y dializaron. Las paredes celulares con las proteínas adsorbidas se resuspendieron en 1 ml de tampón acetato sódico 50 mM pH 5,5 y se incubaron en tubos Eppendorf a 37°C durante 24 horas para permitir la digestión de las paredes celulares y la liberación de las proteínas adsorbidas. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 13.000 g durante 5 minutos, se recogió el sobrenadante, y se dializó frente a agua destilada. El análisis de las proteasas presentes en las distintas fracciones se realizó mediante un ensayo de actividad en gel caseína-SDS-PAGE [Ejemplo 1.2].

1.4 *Identificación de proteínas con actividad proteolítica*

Para la identificación de proteínas con actividad proteolítica secretadas por *T. harzianum* CECT 2413 se realizaron pre-cultivos del hongo en medio mineral mínimo (MM) suplementado con glucosa al 2% tal como se ha indicado en el Ejemplo 1.1. Una vez crecido el micelio, se recogió y se transfirió a medio MM conteniendo como única fuente de carbono paredes celulares purificadas de *C. acutatum* (condiciones de micoparasitismo simulado) o glucosa al 2% (condiciones de represión por fuente de carbono para otras enzimas descritas).

Las suspensiones de paredes celulares de *C. acutatum* y *B. cinerea* se prepararon a partir de micelio. Las células se rompieron en mortero en presencia de nitrógeno líquido, y se lavaron numerosas veces con

NaCl 2M y seguidamente con agua destilada, centrifugando durante 5 minutos a 8.000 rpm en centrífuga Sorvall modelo RC5-C con rotor GSA, y recogiendo el precipitado en cada lavado. Posteriormente, las paredes obtenidas se recogieron por filtración en kitasato, se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  y se liofilizaron durante 12 horas en un liofilizador Virtis Centry<sup>TM</sup>, conservándose a temperatura ambiente hasta su utilización.

5 El grado de purificación se determinó observando al microscopio óptico la ausencia de material citoplasmático y de membrana plasmática.

10 Los sobrenadantes de los cultivos de *T. harzianum* recogidos a las 9, 24, y 48 horas, concentrados y dializados, se analizaron mediante un ensayo de actividad proteolítica en gel caseína-SDS-PAGE [Ejemplo 1.2].

A partir de cultivos en presencia de paredes celulares se detectó una única banda de actividad a una altura inferior a la esperada para la proteasa Prb1 de 31 kDa descrita en *T. harzianum* por Geremia y col. (Geremia, R.A., Goldman, G.H., Jacobs, D., Ardiles, W., Vila, S.B., van Motagu, M. and Herrera-Estrella, A. (1993). Molecular characterization of the proteinase-encoding gene, prb1, related to mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. Molecular Microbiology 83: 603-613), y que con el tiempo de cultivo se mostró más intensa. En los cultivos mantenidos 24 ó 48 horas se observaron, además, otras zonas de actividad proteolítica que no siempre aparecían bien definidas. A partir de los sobrenadantes de cultivos con glucosa como fuente de carbono, no se detectaron bandas de actividad, a excepción de una banda muy tenue después de 48 horas de cultivo.

20 La caseína empleada como sustrato en este tipo de ensayos de actividad proteolítica suele utilizarse para la detección, en principio, de todo tipo de proteasas; no obstante en la detección de metalo-proteasas se recomienda el uso de gelatina (Wang, K.K.W., 1999. Detection of proteolytic Enzymes using Protein substrates. En: Proteolytic Enzymes. Tools and Targest.PP. 49-62. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, NY). Ensayos mediante gelatina-SDS-PAGE de los sobrenadantes anteriores no revelaron nuevas bandas de actividad, y las ya observadas desaparecieron o aparecieron con menor intensidad.

30 Para conocer la afinidad por paredes celulares fúngicas de las enzimas con actividad proteolítica producidas por *T. harzianum* CECT 2413 mediante el protocolo descrito en el Ejemplo 1.4, se sometieron alícuotas de 2 ml del sobrenadante del cultivo mantenido 48 horas en presencia de paredes celulares, a un proceso de adsorción-digestión con paredes celulares purificadas de *C. acutatum* o de *Botrytis cinerea*, tal y como se describe en el Ejemplo 1.3. En la fracción adsorbida a las paredes celulares de *C. acutatum* o de *B. cinerea* se detectó una única banda de actividad, mientras que las demás isoenzimas permanecieron únicamente en la fracción no adsorbida.

35 La afinidad de dicha enzima con actividad proteolítica por la estructura de la pared celular sugería que podía formar parte de la batería de enzimas implicadas en el micoparasitismo, por lo que se procedió a su purificación y caracterización.

#### 40 Ejemplo 2

*Purificación de una enzima de T. harzianum con actividad proteolítica con afinidad a paredes celulares fúngicas*

45 La purificación de enzimas con actividad proteolítica obtenida mediante el protocolo descrito en el Ejemplo 1 se realizó a partir del sobrenadante de un cultivo de *T. harzianum* CECT 2413 mantenido durante 48 horas en medio MM con paredes celulares de *C. acutatum* como fuente de carbono. Para ello, 2 ml del sobrenadante dializado y concentrado 75 veces se sometieron a cromatoenfoco para separar proteínas en base a su punto isoeléctrico. Los perfiles de elución obtenidos muestran 2 picos de actividad proteolítica sobre azocaseína, uno eluido a pH básico, coincidiendo con el pico de proteína mayoritario, y otro a pH ácido. La isoenzima que coincidía en movilidad electroforética con la banda correspondiente a la proteasa con afinidad por paredes celulares de hongos y que era la de mayor interés, fue localizada en este segundo pico mediante el ensayo de actividad en gel caseína-SDS-PAGE (Ejemplo 1.2), lo que indica que se trataba de una proteasa ácida de pI 4,7-4,9.

55 Las fracciones se mezclaron, se concentraron en Centricón -10 (Amicon) y se sometieron a cromatografía de filtración en gel. Las fracciones que presentaron mayor actividad proteolítica, se reunieron y se concentraron de nuevo en Centricón-10. El posterior análisis mediante SDS-PAGE y caseína-SDS-PAGE permitió comprobar la homogeneidad de la preparación obtenida, en la que se observó una única banda de proteína y de actividad proteolítica respectivamente. La enzima purificada con actividad proteolítica y pI ácido ha sido denominada Pra1 y ha sido utilizada para su caracterización.

Ejemplo 3

Caracterización de la proteasa Pra1

3.1 Peso molecular

El peso molecular calculado después de SDS-PAGE y tinción con azul de Coomasie fue de 28,5 kDa aproximadamente [Laemmli, E.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. Nature 227: 6]. Cuando al tampón de carga se le añadió el agente reductor 2-mercaptoetanol, no se observaron cambios en el peso molecular, lo que indica la inexistencia de subunidades asociadas por puentes disulfuro, al menos, de diferente peso molecular.

3.2 Microsecuenciación

La secuenciación de péptidos obtenidos a partir de la proteasa Pra1 purificada se realizó con el doble fin de comparar las secuencias de aminoácidos con las contenidas en las bases de datos y de llevar a cabo el diseño de oligonucleótidos degenerados que permitiera clonar el gen que codifica Pra1.

La secuenciación del extremo amino-terminal y de péptidos internos de Pra1 fue realizada por el servicio de secuenciación Eurosequence b.v. (Groningen, Holanda). Para cada una de las secuencias se partió de 1 nmol de proteína purificada y posteriormente recortada del gel después de SDS-PAGE y tinción con azul de Coomasie. La obtención de péptidos internos se realizó por digestión enzimática de la proteína con tripsina, y posterior extracción y purificación mediante RP-HPLC. El proceso de secuenciación se llevó a cabo siguiendo el método de degradación de Edman en un secuenciador automático Applied Biosystems modelo 494 conectado en fase con un aparato de RP -HPLC para la identificación de los PTH-aminoácidos liberados.

En la Tabla 1 se muestran las secuencias obtenidas del péptido amino-terminal y de un péptido interno de Pra1. Ambos mostraron similitud con secuencias de aminoácidos de proteasas como tripsinas (o tipo-tripsina) mayoritariamente, kalikreina, o activador del plasminógeno. Todas estas enzimas forman parte de la familia S1 de las serin-peptidasas cuyo enzima representativo es la quimotripsina y que está constituida por enzimas con actividad endopeptidasa.

TABLA 1  
Secuencias de péptidos

Péptidos de Pra1	Proteínas	Organismo (Reino*)	Id. (%)
<i>Amino-terminal:</i>	Tripsina ALP1	<i>Cochliobulus carbonum</i> (Fungi)	84,6
IVGGTTAALGEFP	Tripsina I	<i>Ascatus fluviatilis</i> (Metazoa)	84,6
	Precursor de tripsina	<i>Pacifastus leniusculus</i> (Metazoa)	84,6
	Proteasa tipo tripsina SNP-1	<i>Phaeosphaeria nodorum</i> (Fungi)	76,9
	Precursor de proteasa tipo tripsina	<i>Metarhizium anisopliae</i> (Fungi)	76,9
	Precursor de tripsinógeno	<i>Streptomyces fradiae</i> (Bacteria)	76,9
	Precursor de tripsina	<i>Streptomyces griseus</i> (Bacteria)	76,9
	Proteasa tipo tripsina	<i>Streptomyces exfoliatus</i> (Bacteria)	76,9
	Precursor de serin proteasa tipo quimotripsina	<i>Haliotis rufescens</i> (Metazoa)	76,9
	Serin-proteasa tipo tripsina SP-8	<i>Ctenophalides felis</i> (Metazoa)	76,9
	Precursor de kalikreina de plasma	<i>Mus musculus</i> (Metazoa)	76,9
	Precursor de tripsina	<i>Fusarium oxysporum</i> (Fungi)	69,2

TABLA 1 (Continuación)

	Péptidos de Pra1	Proteínas	Organismo (Reino*)	Id. (%)
5	Interno:	Precursor de tripsina	<i>Fusarium oxysporum</i> (Fungi)	73,3
	DSXSGDSGGPIIDP SG	Proteasa tipo tripsina SNP-1	<i>Phaeosphaeria nodorum</i> (Fungi)	73,3
10		Precursor de proteasa tipo tripsina	<i>Metarhizium anisopliae</i> (Fungi)	66,6
		Serin proteasa (tripsina)	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (bacteria)	66,6
15		Precursor de tripsina	<i>Phedon cocleariae</i> (Metazoa)	66,6
		Tripsina ALP1	<i>Cochliobolus carbonum</i> (Fungi)	60,0
20		Activador del plasminógeno	<i>Scolopendra subspinipes</i> (Metazoa)	60,0
	Proteasas tipo tripsina (SP-2, SP-6, SP-28, SP-40)	<i>Ctenocephalides felis</i> (Metazoa)	60,0	
25				

Id: Identidad

Las secuencias del péptido amino-terminal y de los péptidos internos de Pra1 están recogidas dentro de la SEC. ID. N°: 1 que contiene la secuencia putativa completa de aminoácidos de Pra1.

### 3.3 Determinación del tipo de peptidasa mediante ensayos de especificidad para sustratos e inhibición de la actividad proteolítica

#### A. Ensayo de la actividad proteolítica en fase líquida

La actividad proteolítica de la enzima se puede ensayar utilizando azocaseína como sustrato. La mezcla de reacción consta de 250  $\mu$ l de tampón de acetato sódico 100 mM pH 5,5 que contiene la muestra de enzima, 125  $\mu$ l de Brij 35 al 0,1% y 125  $\mu$ l de azocaseína (Sigma). La mezcla de reacción se incuba a 30°C durante un periodo de tiempo comprendido entre 1 y 3,5 horas, parándose la reacción por adición de 200  $\mu$ l de TCA (ácido tricloroacético) al 10%, y el sobrenadante se mide a 366 nm. Una unidad de actividad representa la hidrólisis de 1  $\mu$ g de azocaseína por minuto en las condiciones del ensayo.

#### B. Especificidad para sustratos

Las diferencias en la especificidad para el sustrato son, en general, más útiles en la caracterización y clasificación de las exopeptidasas. No obstante, se conoce la actividad catalítica preferencial por determinados residuos de aminoácidos de muchas endopeptidasas (Powers Powers, J.C. and Kam, C. (1995) Peptide Thioster substrates for serine peptidases and metalloendopeptidasas. En: Methods in Enzymology, 248. 3-18), y así, mediante ensayos de actividad sobre determinados péptidos sintéticos se puede analizar la naturaleza de éstas.

Teniendo en cuenta la información obtenida en el Ejemplo 3.2 se ensayó la actividad endopeptidasa de Pra1 sobre 3 péptidos sintéticos (Sigma) con los extremos amino y carboxilo bloqueados que permiten diferenciar distintos tipos de actividades dentro de la familia S1 de peptidasas:

N-acetil-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA (Arg-pNA) para tripsinas,

N-succinil-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA (Leu-pNA) para elastasas, y

N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (Phe-pNA) para quimotripsinas/ subtilisinas (esta última perteneciente a la familia S8).

La solución enzimática (75 ng) se preparó en 90  $\mu\text{l}$  de tampón fosfato sódico 100 mM y se preincubó durante 5 minutos a 30°C. Las reacciones se iniciaron por adición de 10  $\mu\text{l}$  de solución de sustrato 10 mM precalentado (preparado a partir de soluciones 100 mM en DMSO conservadas a -20°C). Después de 20 minutos de incubación las reacciones se pararon por adición de 50  $\mu\text{l}$  de ácido acético al 2% (v/v).

5 A continuación, se midió la absorbancia de 100  $\mu\text{l}$  a 405 nm en microplacas de 96 pocillos (Immunoplate Maxisorp, NUNC) utilizando un lector automático Titertek Multiskan Plus 311 A0 (Flow Laboratories), y se calcularon los nmoles de p-nitroanilina (p-NA) liberados por minuto. En paralelo se llevaron blancos de enzima sin sustrato, y sustrato sin enzima. La recta patrón se construyó con soluciones de para-nitroanilina (p-NA) (Sigma) a concentraciones conocidas (0-1,25 mM) preparadas a partir de una  
10 solución inicial 5 mM. Esta solución se preparó previa disolución de p-NA en un volumen mínimo de etanol.

La actividad lítica de Pra1 sobre el péptido Arg-pNA confirmó su identidad de endopeptidasa, y además mostró la preferencia de esta proteasa por un residuo apolar (Arg) en la posición P<sub>1</sub>, característica de enzimas tipo tripsina. La actividad específica de Pra1 sobre este sustrato fue de 94.800 U/mg en condiciones óptimas de actividad (30°C y pH 7,5). Se calcularon valores de  $K_m$ ,  $K_{cat}$ , y  $K_{cat}/K_m$  de 0,22 mM, 39,64 s<sup>-1</sup> y 180,18 mM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> respectivamente.

La determinación de los parámetros cinéticos  $K_m$ ,  $K_{cat}$ , y  $K_{cat}/K_m$  se realizó a partir de las velocidades iniciales calculadas en ensayos con distintas concentraciones de sustrato (O, 0,5-2 mM). Para ello, el sustrato se preparó en 0,99 ml de tampón fosfato sódico 100 mM pH 7,5 y se preincubó a 30°C. Entonces la reacción comenzó por adición de 10  $\mu\text{l}$  de la proteasa Pra1 purificada (2,5 ppm) precalentada a la misma temperatura. La actividad se monitorizó durante 10 minutos en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A a 405 nm termostatzado a 30°C. Una unidad de actividad representó la liberación  
20 de 1 nmol p-NA por minuto en las condiciones del ensayo. Como blancos de la reacción se prepararon soluciones de enzima sin sustrato, y sustrato sin enzima. La recta patrón se construyó con soluciones de p-NA (Sigma) a concentraciones conocidas (0-200  $\mu\text{M}$ ), preparadas como se indicó anteriormente. Los parámetros cinéticos se calcularon mediante representaciones de dobles recíprocos o de Lineweaver-Burk (1/V vs 1/S).

30 No se observó actividad lítica de Pra1 sobre Leu-pNA ni sobre Phe-pNA, lo que indica la ausencia de actividad elastasa y quimotripsina/subtilisina respectivamente.

### C. Inhibición de la actividad proteolítica

35 Para determinar el tipo catalítico al que pertenece Pra1 se emplearon inhibidores específicos de los distintos mecanismos catalíticos conocidos. El efecto de dichos inhibidores en la actividad de Pra1 se analizó preincubando la solución enzimática durante 30 minutos a 30°C en tampón fosfato 100 mM pH 7,5 con dichos inhibidores específicos de los distintos mecanismos catalíticos conocidos:

- 40 - PMSF 1 mM (solución inicial 100 mM en isopropanol),
- EDTA 1 mM (solución inicial 100 mM en agua),
- 45 - Pepstatina 0,1 mM (solución inicial 10 mM en DMSO),
- Iodoacetamida 1 mM (solución inicial 100 mM en agua, preparada en el momento de uso).

50 En paralelo al ensayo enzimático se llevaron también controles en presencia del disolvente orgánico en el que se disolvió el inhibidor. La actividad residual se determinó como porcentaje de la actividad en ausencia del inhibidor.

Como cabía esperar para una serin-peptidasa, la actividad lítica de Pra1 se inhibió drásticamente en presencia de PMSF. Este inhibidor irreversible también puede actuar sobre cistein-peptidasas, sin embargo, el agente alquilante iodoacetamida, inhibidor específico de éstas, mostró un débil efecto sobre la actividad de Pra1. Empleando inhibidores como pepstatina o EDTA, Pra1 también conservó más del 90% de su actividad.

60 Los resultados obtenidos permiten afirmar que Pra1 es una serin-endopeptidasa (EC 3.4.21). La pertenencia de Pra1 a la familia S1, y particularmente al grupo de enzimas tipo tripsina (EC 3.4.21.4), se confirmó al analizar la secuencia de aminoácidos completa de la proteína.

### 3.4 Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad de Pra1

Para la determinación de la temperatura óptima de actividad de Pra1 el ensayo enzimático se llevó a cabo en un intervalo de temperaturas comprendido entre 30°C y 85°C. El efecto de la temperatura sobre la estabilidad de Pra1 se determinó preincubando la solución enzimática en tampón fosfato sódico 100 mM pH 7,5 durante 20 minutos a distintas temperaturas (30-85°C). El sustrato utilizado en estos ensayos fue el péptido sintético N-acetil-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA, específico para tripsinas.

El efecto de la temperatura sobre la actividad de la proteasa Pra1 puso de manifiesto que su temperatura óptima está próxima a 35°C. A 45°C la actividad se redujo drásticamente hasta el 16 %, y a partir de 55°C no se detectó actividad. Puesto que a 30°C Pra1 mantiene el 95 % de la actividad, y esta temperatura está próxima a las condiciones en las que se cultiva *Trichoderma*, se tomó como temperatura habitual para los ensayos de actividad.

### 3.5 Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad de Pra1

Para la determinación del pH óptimo de actividad de Pra1 se llevó a cabo el ensayo en los siguientes sistemas de tampones: acetato sódico 100 mM (pH 3-5,5), fosfato sódico 100 mM (pH 6-7), y Tris/HCl 100 mM (pH 7,5-9). El efecto del pH sobre la estabilidad de Pra1 se determinó pre-incubando la solución enzimática (750 ng) durante 24 horas a 4°C en 10 µl de los tampones anteriores. Posteriormente, se tomaron alícuotas de 10 µl para la realización del ensayo en las condiciones estándar.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el pH óptimo de actividad de Pra1 está comprendido entre 7,0 y 8,0. La actividad decreció rápidamente cuando el ensayo se realizó en tampones con pH superior a 8,5 o inferior a 6,5.

El ensayo de actividad de Pra1 realizado en condiciones óptimas (30°C y pH 7,5) después de preincubar el enzima durante 24 horas en tampones a diferentes pH, puso de manifiesto que Pra1 es más estable a pH ácido. La actividad decreció al aumentar el pH de preincubación, con una reducción del 40 % a pH 7. No se detectó actividad proteolítica después de preincubación a pH 9.

#### Ejemplo 4

##### Clonación de una secuencia de ADNc que codifica Pra1

La clonación del gen que codifica la proteasa Pra1 de *T. harzianum* se realizó a partir de una genoteca de ADNc representativa de la población de moléculas de ARNm que se transcriben en *T. harzianum* CERT 2413 cuando se cultiva en condiciones de micoparasitismo simulado (durante 9 horas en presencia de paredes celulares fúngicas como única fuente de carbono).

#### 4.1 Obtención de ARN total de *T. harzianum*

La extracción de ARN se realizó a partir de 50 mg de micelio de *Trichoderma* pulverizado en mortero en presencia de nitrógeno líquido. El micelio se transfirió a tubos de 10 ml a los que se les añadió 4 ml de solución de lisis "ARNol yellow" [20 ml de solución D (isotiocianato de guanidinio 4 M, citrato sódico 25 mM pH 7,0, sarcosil 0,5% (p/v), autoclavar y añadir 2-mercaptoetanol a una concentración final de 0,7% (v/v)], 2 ml de acetato sódico 2M y 20 ml de fenol ácido]. Las muestras se homogeneizaron por agitación en vortex y mezclando con micropipeta. Posteriormente se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos y se transfirieron a tubos Eppendorf en alícuotas de 1 ml. A cada tubo se le añadió 0,2 ml de cloroformo, agitando en vortex durante 15 segundos, e incubando a temperatura ambiente durante 2-3 minutos. Seguidamente se centrifugaron a 12.000 g a 4°C durante 15 minutos. Al sobrenadante recogido se le añadió 1 volumen de alcohol isopropílico, incubándose a temperatura ambiente durante 15 minutos para permitir la precipitación del ARN. Posteriormente el ARN se recogió por centrifugación a 12.000 g a 4°C durante 10 minutos, se lavó con 1 ml de etanol 70% agitando en vortex hasta separar el precipitado del tubo, y se centrifugó a 4.000 g a 4°C durante 5 minutos. Seguidamente el etanol se eliminó por inversión, y el precipitado se dejó secar al aire y se resuspendió en 40 µl de agua. El ARN obtenido se cuantificó por espectrofotometría, y su integridad se comprobó por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se conservó a -80°C.

A partir de 1 mg de ARN total extraído de micelio crecido en las condiciones anteriormente mencionadas se purificaron por cromatografía de afinidad 7,8 µg de ARNm que se utilizaron para la construcción de la genoteca en el vector Uni-ZAP® XR (Stratagene).

#### 4.2 Construcción y manipulación de una genoteca de ADNc de *T. harzianum* CECT 2413 en el vector Uni-ZAP<sup>®</sup> XR

5 Se empleó el sistema de clonación ZAP-cDNA<sup>®</sup> Gigapack<sup>®</sup> III Gold Cloning Kit diseñado por Stratagene (Ref. 200450). El procedimiento experimental se realizó, en su mayor parte, siguiendo las indicaciones del protocolo que proporciona la firma comercial tanto para la construcción como para la manipulación de la genoteca.

10 A partir del ARNm purificado de 1 mg de ARN total se llevaron a cabo los procesos de síntesis de la primera y segunda cadena de ADNc, el relleno de los extremos del ADNc bicatenario, el ensamblaje de éste a los adaptadores EcoRI, la fosforilación de los extremos, y la digestión con la endonucleasa de restricción XhoI, utilizando los reactivos que proporciona la firma comercial Stratagene, y siguiendo detalladamente las recomendaciones del protocolo adjunto, con la excepción de que no se incorporaron  
15 nucleótidos radiactivos para el seguimiento del proceso. La posterior separación del ADNc del exceso de adaptadores se realizó mediante cromatografía de filtración en gel utilizando columnas de la casa comercial Pharmacia. A continuación, 150 ng aproximadamente de ADNc se ligaron a 1  $\mu$ g de ADN vector (predigerido con las enzimas de restricción EcoRI/XhoI) en un volumen de reacción recomendado de 5  $\mu$ l, de los cuales 2  $\mu$ l se utilizaron para el proceso final de encapsidación del ADN en el interior de  
20 las partículas del fago siguiendo las indicaciones de la firma comercial. La eficiencia de encapsidación resultó de  $4,9 \cdot 10^6$  fagos recombinantes/ $\mu$ g de vector, y el título de la genoteca primaria de  $4 \cdot 10^6$  unidades formadoras de placas (u.f.p.)/ml ( $2 \cdot 10^6$  en total), con tan solo un 0,3% de fagos no recombinantes. La genoteca primaria, resultante del proceso descrito se conservó a 4°C durante un tiempo inferior a 1 mes antes de su amplificación.

25 Dada la inestabilidad de las genotecas primarias, se hace necesaria su amplificación a pesar de la pérdida de representatividad de los clones menos abundantes. El proceso se realizó infectando 600  $\mu$ l de células *E. coli* XL1-Blue con volúmenes correspondientes a 50.000 u.f.p (unidades formadoras de placa) de la genoteca primaria. La mezcla de infección se incubó a 37°C durante 15 minutos para permitir el  
30 ataque de los fagos y posteriormente se añadió a tubos con 7 ml NZY (medio de cultivo de bacterias adecuado para el crecimiento de fagos) de cobertera precalentado a 48°C. Los tubos se agitaron en vortex y el contenido se extendió inmediatamente en placas Petri de 15 cm con medio NZY sólido. Las placas se incubaron a 37°C hasta que se observaron halos de lisis confluentes. A continuación, se añadieron 10 ml de tampón SM [NaCl 100 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, gelatina al 0,01% (p/v)] y  
35 se incubaron de nuevo a 4°C en balanceo suave para permitir la difusión de los bacteriófagos al tampón. Transcurridas 12 horas se recogió y se mezcló el tampón de las distintas placas, lavando cada una de ellas con 2 ml de tampón adicionales. La mezcla recogida se agitó vigorosamente en presencia de cloroformo al 5% (v/v), y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de centrifugar a 500 g durante 10 minutos, el sobrenadante con los bacteriófagos libres de restos celulares se transfirió a un  
40 recipiente de cristal. En este momento la genoteca de ADNc quedó lista para ser utilizada. Se tituló, y se almacenó a 4°C en presencia de cloroformo al 0,3% (v/v), así como a -80°C en presencia de DMSO al 7%. La amplificación de 1 millón de u.f.p. proporcionó una genoteca amplificada  $2,5 \cdot 10^6$  veces, con un título de  $1,6 \cdot 10^{10}$  u.f.p /ml.

#### 45 4.3 Rastreo de la genoteca

##### A. Obtención de la sonda de *pra1*

50 La búsqueda del clon de ADNc correspondiente a la proteasa Pra1 en la genoteca amplificada se realizó por hibridación utilizando una sonda de ADN previamente obtenida por PCR a partir de la genoteca en fagémidos pBluescript SK(-) derivada de la escisión en masa de  $20 \cdot 10^6$  u.f.p. Dicha genoteca en fagémidos pBluescript SK(-) presentó un título de  $3,3 \cdot 10^6$  fagémidos/ml ( $66 \cdot 10^6$  en total).

55 Para la obtención de dicha sonda, se realizó una PCR a partir del ADN fagémido extraído de un millón de clones bacterianos, utilizando como iniciadores los oligonucleótidos degenerados:

PPra1: 5'ACTGCIGC(G/T)TTIGGIGA(A/G)TT(T/C)CC-3' (sentido) [SEC. ID. N°: 3]; y

Pra1IA: 5'-GGGTCTAT(T/G)ATIGGCCICC-3' (antisentido) [SEC. ID. N°: 4]

60 diseñados a partir de la secuencia de aminoácidos de los péptidos amino-terminal e interno respectivamente de la proteasa Pra1. La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 25  $\mu$ l conteniendo

tampón de PCR 1X, preparado a partir de tampón 10X, proporcionado con el enzima, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTPs 200 μM, 1,25 unidades de Taq polimerasa (EcoTaq), 4 μM de cada oligonucleótido iniciador, y aproximadamente 10 ng de ADN fagémido. Las condiciones de amplificación consistieron en un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos a 95°C (desnaturalización) durante 1 minuto, 55°C (hibridación de los iniciadores) durante 1 minuto y 72°C (extensión) durante 1 minuto, finalizando con un ciclo de extensión final a 72°C durante 5 minutos. Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,2% y los fragmentos de interés se extrajeron del gel y se subclonaron en *E. coli* utilizando el plásmido pGEM<sup>®</sup>-T como vector, para su posterior secuenciación.

Como resultado de la reacción se observó repetidamente un producto de amplificación de aproximadamente 550 pb que, una vez recuperado del gel, se subclonó en el vector pGEM<sup>®</sup>-T (Promega). La secuenciación de este fragmento permitió comprobar que contenía las secuencias que codificaban los péptidos conocidos de Pra1, de manera que se utilizó como sonda para rastrear la genoteca en el vector Uni-ZAP<sup>®</sup> XR y aislar el ADNc completo de *pra1*.

#### B. Transferencia de ADN de bacteriófagos a membranas

Se prepararon placas de Petri de 15 cm con 50.000 u.f.p, aproximadamente, procedentes de la genoteca de ADNc amplificada. Una vez obtenidos los halos de lisis, las placas se dejaron enfriar para que el agar de cobertera adquiriera mayor consistencia. Se colocó una membrana de nylon (Hybond-N, Amersham) sobre la superficie del agar, evitando las burbujas. La membrana se dejó durante 5 minutos para permitir la transferencia de los fagos, y se marcó de forma asimétrica con una aguja para poder orientarla a la hora de recuperar de la placa el clon o clones de interés. Las membranas se retiraron cuidadosamente de las placas (que se almacenaron a 4°C) y se trataron con Solución de desnaturalización Southern I durante 2 minutos, seguidamente con Solución de neutralización Southern II durante 5 minutos, y finalmente con tampón SSC 2X, preparado a partir de SSC 20X, durante 5 minutos. Estos tratamientos se realizaron depositando las membranas, con la cara que estuvo en contacto con los fagos hacia arriba, sobre papel Whatman 3MM empapado con la solución correspondiente. Posteriormente, las membranas se dejaron secar al aire y el ADN transferido se fijó covalentemente a la membrana. Posteriormente, las membranas se incubaron a 65°C, con agitación constante, en solución de hibridación [SSPE 5X (SSPE 20X: NaCl 3,6 M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 M, EDTA 20 mM pH 7,7), Solución Denhardt 5X (Solución Denhardt 100X: BSA 2% (p/v), Ficoll<sup>TM</sup> 2% (p/v), PVP 2% (p/v)), SDS 0,5% (p/v)] durante 2 horas. Seguidamente, se añadió la sonda de ADN marcada radiactivamente, y se continuó la incubación durante 12-18 horas. Transcurrido este tiempo, se retiró la sonda, y la membrana se lavó con solución de lavado [SSPE 2X, SDS 1% (p/v)] a temperatura ambiente durante 15 minutos, y después dos veces más a 65°C. Finalmente, las membranas se envolvieron con una película de plástico transparente para evitar que se secaran, y se expusieron con pantallas amplificadoras para la detección de los clones positivos.

De un total de 2.10<sup>5</sup> clones escrutados se identificaron 3 bacteriófagos que mostraban señal de hibridación positiva, y que fueron aislados en dos rondas de hibridación sucesivas. Una vez recuperados como fagémidos pBluescript SK(-), se liberaron los insertos de cada uno por digestión con las enzimas EcoRI/XhoI. Los tres clones presentaron un tamaño de inserto próximo a 1 kb. A partir de la secuencia obtenida de uno de estos clones (pSKPra1) se obtuvo la secuencia deducida de aminoácidos. Esta secuencia de aminoácidos contenía los péptidos (aminoterminal e interno) secuenciados de la proteasa Pra1 purificada, confirmando que el ADNc clonado era el que codificaba a esta proteína.

#### 4.4 Análisis de la secuencia

El ADNc clonado presentó un tamaño de 954 pb, incluyendo la cola de poliA del extremo 3', con una pauta de lectura abierta de 777 pb que codifica una proteína de 258 aminoácidos y peso molecular teórico de 25.784 Da. Esta secuencia de aminoácidos deducida contiene los péptidos (amino-terminal e interno) secuenciados de la proteasa Pra1 purificada, confirmando que el ADNc clonado es el que codifica a esta proteína.

La secuencia conocida del péptido amino-terminal de Pra1 indica que la proteína madura comienza en el residuo I<sup>1</sup>, de lo que se deduce que Pra1 es sintetizada como un precursor con una extensión en el extremo amino-terminal de 29 aminoácidos. El peso molecular calculado a partir de la secuencia de la proteína madura (I<sup>1</sup>-G<sup>228</sup>) es de 25.023 Da, ligeramente inferior al determinado mediante SDS-PAGE a partir de la proteína Pra1 purificada (esta divergencia entre el peso teórico y el peso determinado parece ser debida a posibles modificaciones posttraduccionales, tales como glicosidaciones).



## ES 2 171 136 B1

Por otro lado, el punto isoelectrico estimado a partir de la secuencia de la proteína madura es de 4,91, coincidente con el observado mediante isoelectroenfoque preparativo (4,7-4,9).

Al analizar la secuencia de la región amino-terminal mediante el programa SignalP V1.1 se reconoció un punto de corte entre los aminoácidos G<sup>-10</sup>-A<sup>-9</sup>, sugiriendo la existencia de un péptido señal constituido por los primeros 20 aminoácidos, característico de proteínas secretadas. Los 9 aminoácidos existentes entre el péptido señal y la proteína madura corresponderían al pro-péptido característico de muchas proteasas, que en el caso de las serin-peptidasas de la familia S1 varía de 6-9 aminoácidos, y que, una vez procesados, dan lugar a un nuevo extremo amino-terminal que generalmente comienza con un residuo hidrofóbico como valina, metionina, leucina, o isoleucina, lo que está en concordancia con el residuo isoleucinal que presenta Pra1.

La comparación de la secuencia completa de aminoácidos de Pra1 con las contenidas en los bancos de datos (EMBL y Swiss Prot) mostró la alta similitud de esta proteína con miembros de la familia S1 de la serin-peptidasas como tripsinas y proteínas tipo tripsina de rata, cerdo, etc. La máxima homología (75-80%) con identidades iguales o inferiores al 50% la presentó con proteínas tipo tripsina de hongos filamentosos (*Metharrizium*, *Fusarium*). Las secuencias de proteasas fúngicas con las que se comparó fueron las siguientes:

Hongo	N° de identificación EMBL/Swiss Prot
<i>Chliobolus carbonum</i>	Q00344
<i>Fusarium oxysporum</i>	P35049
<i>Metharrizium anisocliae</i>	Q9Y7A9
<i>Metharrizium anisocliae</i>	Q9Y842
<i>Phaeosphaeria nodurum</i>	074696

El alineamiento con estas secuencias permitió reconocer la tríada catalítica (H-D-S) característica de la familia S1 así como de las distintas familias que forman parte del clan PA, y que se asignó putativamente a los residuos H<sup>70</sup> D<sup>118</sup> y S<sup>213</sup> de la secuencia deducida de Pra1.

REIVINDICACIONES

1. Una enzima con actividad proteolítica **caracterizada** porque tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:
- 5 a) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. ID. N°: 1, y
- b) una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga y funcionalmente equivalente a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. ID. N°: 1.
- 10 2. Enzima según la reivindicación 1, **caracterizada** porque tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. ID. N°: 1.
- 15 3. Enzima según la reivindicación 2, **caracterizada** porque tiene un peso molecular aparente determinado en condiciones desnaturalizantes de 28,5 kDa aproximadamente.
4. Enzima según la reivindicación 2, **caracterizada** porque tiene un punto isoeléctrico aparente comprendido entre 4, 7 y 4,9.
- 20 5. Enzima según la reivindicación 2, **caracterizada** porque tiene una temperatura óptima comprendida entre 35°C y 40°C.
6. Enzima según la reivindicación 2, **caracterizada** porque es una serin-peptidasa.
- 25 7. Enzima según la reivindicación 2, **caracterizada** porque es una endopeptidasa de tipo tripsina.
8. Una construcción de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica una enzima según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o un fragmento de la misma.
- 30 9. Construcción de ADN según la reivindicación 8, **caracterizada** porque tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:
- a) una secuencia de ADN que comprende la SEC. ID. N°: 2; o
- 35 b) una secuencia de ADN análoga a la secuencia definida en a) que (i) es sustancialmente homóloga a la secuencia de ADN definida en a); y/o (ii) codifica un polipéptido que es sustancialmente homólogo a la proteína codificada por la secuencia de ADN definida en a).
- 40 10. Un vector recombinante **caracterizado** porque contiene una construcción de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9.
11. Una célula **caracterizada** porque contiene una construcción de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9, o un vector según la reivindicación 10.
- 45 12. Una célula transgénica de una planta que comprende una construcción de ADN que tiene un promotor, funcional en dicha planta, operativamente enlazado a una construcción de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9.
- 50 13. Una planta transgénica que comprende, al menos, una célula transgénica según la reivindicación 12.
14. Planta transgénica según la reivindicación 13, que expresa una enzima con actividad proteolítica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para mejorar la resistencia a patógenos mediante la inactivación irreversible de enzimas y proteínas responsables del ataque a la planta.
- 55 15. Un método para la producción de una enzima según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende cultivar una célula según la reivindicación 11 bajo condiciones que permiten la producción de la enzima y recuperar la enzima del medio de cultivo.
- 60 16. Una preparación enzimática que comprende, al menos, una enzima según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

## ES 2 171 136 B1

17. Preparación enzimática según la reivindicación 16, que comprende entre 0,01 % y 100 % en peso de una enzima según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

18. Preparación enzimática según la reivindicación 16, que contiene como único componente una enzima según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

19. Preparación enzimática según la reivindicación 16, que contiene más de una enzima según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

20. Preparación enzimática según la reivindicación 16, que comprende, además, al menos una enzima seleccionada del grupo formado por celulasas, glucanasas, mananasas, quitinasas, proteasas y/o quitosanasas.

21. Una composición antifúngica que comprende, al menos, una enzima según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 junto con, al menos, un fungicida químico.

22. Composición según la reivindicación 21, en la que dicho fungicida químico se selecciona del grupo formado por un fungicida químico que afecta a la membrana, un fungicida químico que afecta a la síntesis de la pared celular y sus mezclas.

23. Composición según la reivindicación 21, que comprende, además, al menos, una proteína con actividad enzimática degradadora de la pared celular microbiana.

24. Empleo de una enzima según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o de una preparación enzimática según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, o de una composición antifúngica según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, para degradar o modificar materiales que contienen enlaces peptídicos.

25. Empleo según la reivindicación 24, en el que dicho material que contiene enlaces peptídicos comprende estructuras que comprenden proteínas o péptidos.

26. Empleo según la reivindicación 25, en el que dichas estructuras que comprenden proteínas o péptidos se seleccionan entre paredes celulares fúngicas y cutículas de insectos o arácnidos.

27. Empleo según la reivindicación 24, en el que dicha enzima, preparación enzimática o composición antifúngica se utiliza para la preparación de protoplastos.

28. Empleo según la reivindicación 24, en el que dicha enzima, preparación enzimática o composición antifúngica se utiliza para la preparación de extractos de levaduras.

29. Empleo según la reivindicación 24, en el que dicha enzima, preparación enzimática o composición antifúngica se utiliza en la extracción de manoproteínas.

30. Empleo según la reivindicación 24, en el que dicha enzima, preparación enzimática o composición antifúngica se utiliza en la producción de vinos, mostos y zumos.

31. Empleo según la reivindicación 24, en el que dicha enzima, preparación enzimática o composición antifúngica se utiliza en la elaboración de composiciones para retirar la placa dental.

32. Empleo según la reivindicación 24, en el que dicha enzima, preparación enzimática o composición antifúngica se utiliza en la elaboración de composiciones para la limpieza de dientes y dentaduras.

33. Empleo según la reivindicación 24, en el que dicha enzima, preparación enzimática o composición antifúngica se utiliza en la elaboración de composiciones para retirar películas biológicas (biofilms) depositadas en superficies.

34. Empleo según la reivindicación 24, en el que dicha enzima, preparación enzimática o composición antifúngica se utiliza en la elaboración de composiciones para la limpieza de lentes de contacto.

35. Empleo según la reivindicación 24, en el que dicha enzima, preparación enzimática o composición antifúngica se utiliza en la eliminación de hongos sobre recubrimientos.

## ES 2 171 136 B1

36. Empleo según la reivindicación 24, en el que dicha enzima, preparación enzimática o composición antifúngica se utiliza para tratar y/o limpiar tejidos.

5 37. Empleo según la reivindicación 24, en el que dicha enzima, preparación enzimática o composición antifúngica, se utiliza en el control de organismos patógenos de plantas, animales, incluido el hombre y contaminantes de cosechas o alimentos.

10 38. Empleo según la reivindicación 37, en el que el control de organismos patógenos de plantas, animales, incluido el hombre y contaminantes de cosechas o alimentos por dicha enzima, preparación enzimática o composición antifúngica, se efectúa mediante inactivación proteolítica irreversible de enzimas y/o proteínas estructurales utilizadas por los patógenos en su ataque a las plantas y animales.

15 39. Empleo según la reivindicación 24, en el que dicha enzima, preparación enzimática o composición antifúngica, se utiliza para desinfectar, prevenir y/o tratar la infección causada por hongos patógenos de animales en instalaciones ganaderas.

40. Empleo según la reivindicación 24, en el que dicha enzima, preparación enzimática o composición antifúngica, se utiliza para controlar la contaminación fúngica en una muestra de ensayo para análisis.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

# ES 2 171 136 B1

## LISTAS DE SECUENCIAS

<110> NEWBIOTECHNIC, S.A.

5 UNIVERSIDAD DE SEVILLA

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

<120> ENZIMA CON ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA, CONSTRUCCIÓN DE ADN QUE COM-  
10 PRENDE UNA SECUENCIA DE ADN QUE CODIFICA DICHA ENZIMA Y SUS APLICACIONES

<130> PROTEASA T HARZIANUM

<140>

15

<141>

<160> 4

20 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 258

25

<212> PRT

<213> Trichoderma harzianum

30 <400> 1

Met Ala Pro Val Leu Ala Ile Ala Ser Val Leu Ala Ala Leu Pro Ala

35

1

5

10

15

Leu Thr Met Gly Ala Ala Ile Thr Pro Arg Gly Ser Asp Ile Val Gly

40

20

25

30

Gly Thr Thr Ala Ala Leu Gly Glu Phe Pro Tyr Ile Val Ser Leu Ser

45

35

40

45

Thr Gly Gly Ser His Phe Cys Gly Gly Val Leu Ile Asp Ser Arg Thr

50

50

55

60

55

60

# ES 2 171 136 B1

Val Val Thr Ala Gly His Cys Thr Ile Asp Gln Arg Ala Ser Ser Val  
 65 70 75 80  
 5

Lys Val Arg Ala Gly Thr Leu Thr Trp Ala Ser Gly Gly Thr Gln Val  
 85 90 95  
 10

Gly Val Ser Ser Leu Thr Leu His Pro Ser Tyr Thr Val Asp Ser Gln  
 100 105 110  
 15

Gly Val Pro Asp Asn Asp Val Gly Val Trp His Leu Ala Thr Ala Ile  
 115 120 125  
 20

Pro Thr Ser Ser Thr Ile Gly Tyr Ala Thr Leu Pro Ala Ser Gly Ser  
 130 135 140  
 25

Asp Pro Ala Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val Ala Gly Trp Gly Thr Thr  
 145 150 155 160  
 30

Ser Glu Asn Ser Asn Ser Leu Pro Ser Thr Leu Arg Lys Val Ser Val  
 165 170 175  
 35

Pro Val Val Ala Arg Ala Thr Cys Asp Ser Asp Tyr Asp Gly Glu Ile  
 180 185 190  
 40

Ser Asn Asn Met Phe Cys Ala Ala Val Ala Ala Gly Gly Lys Asp Ser  
 195 200 205  
 45

Cys Ser Gly Asp Ser Gly Gly Pro Ile Ile Asp Pro Ser Gly Thr Leu  
 210 215 220  
 50

Val Gly Val Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Glu Arg Gly Phe Pro  
 225 230 235 240  
 55

Gly Val Tyr Thr Arg Leu Gly Asn Tyr Val Ser Phe Ile Asn Ser Asn  
 245 250 255  
 60

Arg Gly

# ES 2 171 136 B1

<210> 2

<211> 777

5 <212> ADN

<213> *Trichoderma harzianum*

<400> 2

10

```
atggctcccc ttctcgccat cgcctccgtg cttgcagcac ttcccgtctt caccatggga 60
gctgccatca ctctctgtgg cagtgatatc gtcggaggaa cactgctgc cctcggcgag 120
15 tccccctaca ttgtctctct gtccactggt ggctcgcact tctgcggtgg tgttctgatc 180
gactccccga ccgttgtcac cgctggccac tgcaccattg accagagggc ctctctgttc 240
aaggtccgcg ctggaactct tacctgggct tccggtggca cccaggttgg tgtttcatct 300
20 ctgacccttc accccagcta caccgtcgat agccagggtg ttcccgacaa cgatggttgg 360
gtttggcact tggccactgc cattctacc agctctacca tcggttatgc tactcttct 420
gcttctggct cagaccctgc tgccggtacc accctcaccg tcgctggctg gggactact 480
25 tctgagaact ccaactctct cccctccacc ctgaggaagg tttccgtccc cgtcgttgcc 540
cgcgccactt gcgacagcga ctacgatggc gagatcagca acaacatggt ctgcgctgct 600
gttgccgccc gtggcaagga ctctgtctct ggagactctg gtggccccat cattgacccc 660
30 agcggaaacc tggttggtgt tgtttcttgg ggtcagggat gcgctgaccg tggattcccc 720
ggtgtttaca ctcgctggtg caactacgtc agcttcatca acagcaaccg tggttaa 777
```

35 <210> 3

<211> 23

<212> ADN

40

<400> 3

actgcigcdt tiggigartt ycc

23

45

<210> 4

<211> 20

50 <212> ADN

<400> 4

gggtctatda tiggiccic

20

55

60



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.<sup>7</sup>: C12N 9/58, 15/57, 15/63, A01H 5/00, A01N 63/00

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	DUNAEVSKY Y.E. et al. "Enzymes secreted by filamentous fungi: regulation of secretion and purification of an extracellular protease of <i>Trichoderma harzianum</i> ". Junio 2000, Biochemistry (Moscow), Vol. 65 (6), páginas 723-727.	1-7
A	WO 9618722 A (CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL I.P.N.) 20.06.1996, todo el documento.	1,2,8-12
A	GEREMIA R.A. et al. "Molecular characterization of the proteinase-encoding gene, <i>prb1</i> , related to mycoparasitism by <i>Trichoderma harzianum</i> ", 1993, Mol. Microbiol., Vol 8 (3), páginas 603-613.	1-7

**Categoría de los documentos citados**

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

**Fecha de realización del informe**

21.02.2002

**Examinador**

A. Collados Martín Posadillo

**Página**

1/1