



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 275 011**

(51) Int. Cl.:
C07K 14/37 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **02781165 .2**

(86) Fecha de presentación : **20.11.2002**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1448595**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **25.08.2004**

(54) Título: **Polipéptidos antimicrobianos de *Pseudoplectania nigrella*.**

(30) Prioridad: **20.11.2001 DK 2001 01732**
23.08.2002 DK 2002 01243

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2007

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

(72) Inventor/es: **Schnorr, Kirk, Matthew;**
Hansen, Mogens, Trier;
Mygind, Per, Holse;
Segura, Dorotea, Raventos y
Kristensen Hogenhaug, Hans-Henrik

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

ES 2 275 011 T3

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

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos antimicrobianos de *Pseudoplectania nigrella*.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a polipéptidos con actividad antimicrobiana y a polinucleótidos con una secuencia de nucleótidos que codifica para los polipéptidos. La invención también se refiere a constructos de ácidos nucleicos, vectores, y células huéspedes que comprenden constructos de ácidos nucleicos así como a métodos para producir y
10 usar los polipéptidos.

Antecedentes

Es un objeto de la presente invención el hecho de proporcionar polipéptidos con actividad antimicrobiana y polinucleótidos que codifican los polipéptidos.
15

Resumen

En un primer aspecto la presente invención se refiere a un polipéptido con actividad antimicrobiana, seleccionado del grupo que consiste en:
20

(a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 65% de identidad con los aminoácidos 1 a 40 de la SEC ID NO:2;

(b) un polipéptido que está codificado por una secuencia de nucleótidos que se hibrida bajo condiciones de astringencia media, usando 0.2 X SSC a 42°C para el lavado, con una sonda de polinucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:
25

(i) la cadena complementaria de los nucleótidos 166 a 285 de la SEC ID NO:1,
30

(ii) la cadena complementaria de los nucleótidos 70 a 285 de la SEC ID NO:1, y

(iii) la cadena complementaria de los nucleótidos 1 a 285 de la SEC ID NO:1; y

(c) un fragmento de (a) o (b) con actividad antimicrobiana.
35

En un segundo aspecto la presente invención se refiere a polinucleótidos con una secuencia de nucleótidos que codifica para el polipéptido de la invención.

En un tercer aspecto la presente invención se refiere a un constructo de ácidos nucleicos que comprende la secuencia de nucleótidos, que codifica para el polipéptido de la invención, operativamente enlazado a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un huésped adecuado.
40

En un cuarto aspecto la presente invención se refiere a un vector de expresión recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos de la invención.
45

En un quinto aspecto la presente invención se refiere a una célula huésped recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos de la invención.

En un sexto aspecto la presente invención se refiere a un método para la producción de un polipéptido de la invención, el método comprendiendo:
50

(a) el cultivo de una cepa, que en su forma de tipo salvaje es capaz de producir el polipéptido, para producir el polipéptido; y
55

(b) la recuperación del polipéptido.

En un séptimo aspecto la presente invención se refiere a un método para producir un polipéptido de la invención, el método comprendiendo:
60

(a) el cultivo de una célula huésped recombinante de la invención bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y

(b) la recuperación del polipéptido.
65

Otros aspectos de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción y de las reivindicaciones anexas.

Definiciones

Antes de discutir la presente invención con más detalle, se definirán en primer lugar los términos y convenciones siguientes:

Polipéptido substancialmente puro: En el presente contexto, el término “polipéptido substancialmente puro” significa una preparación polipeptídica que contiene como mucho el 10% en peso de otro material polipeptídico con el cual está originalmente asociada (se prefieren porcentajes inferiores de otro material polipeptídico, p. ej. como máximo el 8% en peso, como mucho el 6% en peso, como mucho el 5% en peso, como mucho el 4%, como mucho el 3% en peso, como mucho el 2% en peso, como mucho el 1% en peso, y como mucho el 1/2% en peso). Así, se prefiere que el polipéptido substancialmente puro tenga al menos el 92% de pureza, es decir que el polipéptido constituya al menos el 92% en peso del material polipeptídico total presente en la preparación, y se prefieren porcentajes más altos tales como al menos el 94% de pureza, al menos el 95% de pureza, al menos el 96% de pureza, al menos el 96% de pureza, al menos el 97% de pureza, al menos el 98% de pureza, al menos el 99%, y como mucho el 99.5% de pureza. Los polipéptidos descritos aquí están preferiblemente en forma substancialmente pura. En particular, se prefiere que los polipéptidos descritos aquí estén en “forma esencialmente pura”, es decir que la preparación polipeptídica esté esencialmente libre de otro material polipeptídico con el cual está originalmente asociada. Esto puede ser realizado, por ejemplo, preparando el polipéptido mediante métodos recombinantes bien conocidos. Aquí, el término “polipéptido substancialmente puro” es sinónimo de los términos “polipéptido aislado” y “polipéptido en forma aislada”.

Actividad antimicrobiana: El término “actividad antimicrobiana” está definido aquí como una actividad que es capaz de matar o de inhibir el crecimiento de las células microbianas. En el contexto de la presente invención el término “antimicrobiano” pretende significar que hay un efecto bactericida y/o bacteriostático y/o fungicida y/o fungistático y/o un efecto virucida, donde el término “bactericida” debe ser entendido como capaz de matar células bacterianas. El término “bacteriostático” debe ser entendido como capaz de inhibir el crecimiento bacteriano, es decir inhibir el crecimiento de las células bacterianas. El término “fungicida” debe ser entendido como capaz de matar células fúngicas. El término “fungistático” debe ser entendido como capaz de inhibir el crecimiento fúngico, es decir de inhibir el crecimiento de las células fúngicas. El término “virucida” debe ser entendido como capaz de inactivar virus. El término “células microbianas” se refiere a células bacterianas o fúngicas (incluyendo las levaduras).

En el contexto de la presente invención el término “inhibir el crecimiento de células microbianas” pretende significar que las células están en estado de no crecimiento, es decir, que no son capaces de propagarse.

Para los fines de la presente invención, la actividad antimicrobiana puede ser determinada según el procedimiento descrito por Lehrer *et al.*, Journal of Immunological Methods, Vol. 137 (2) pp. 167-174 (1991).

Los polipéptidos que tienen actividad antimicrobiana pueden ser capaces de reducir el número de células vivas de *Escherichia coli* (DSM 1576) a 1/100 después de 30 min. incubación a 20°C en una solución acuosa del 25%(p/p); preferiblemente en una solución acuosa del 10%(p/p); más preferiblemente en una solución acuosa del 5%(p/p); incluso más preferiblemente en una solución acuosa del 1%(p/p); más preferiblemente en una solución acuosa del 0.5%(p/p); y en particular en una solución acuosa del 0.1%(p/p) de los polipéptidos con actividad antimicrobiana.

Los polipéptidos con actividad antimicrobiana pueden también ser capaces de inhibir la excrecencia de la *Escherichia coli* (DSM 1576) durante 24 horas a 25°C en un sustrato de crecimiento microbiano, al añadirse en una concentración de 1000 ppm; preferiblemente al añadirse en una concentración de 500 ppm; más preferiblemente al añadirse en una concentración de 250 ppm; incluso más preferiblemente al añadirse en una concentración de 100 ppm; más preferiblemente al añadirse en una concentración de 50 ppm; y en particular al añadirse en una concentración de 25 ppm.

Los polipéptidos con actividad antimicrobiana pueden ser capaces de reducir el número de células vivas de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) a 1/100 después de 30 min. incubación a 20°C en una solución acuosa del 25%(p/p); preferiblemente en una solución acuosa del 10%(p/p); más preferiblemente en una solución acuosa del 5%(p/p); incluso más preferiblemente en una solución acuosa del 1%(p/p); más preferiblemente en una solución acuosa del 0.5%(p/p); y en particular en una solución acuosa del 0.1%(p/p) de los polipéptidos con actividad antimicrobiana.

Los polipéptidos con actividad antimicrobiana pueden también ser capaces de inhibir la excrecencia de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) durante 24 horas a 25°C en un sustrato del crecimiento microbiano, al añadirse en una concentración de 1000 ppm; preferiblemente al añadirse en una concentración de 500 ppm; más preferiblemente al añadirse en una concentración de 250 ppm; incluso más preferiblemente al añadirse en una concentración de 100 ppm; más preferiblemente al añadirse en una concentración de 50 ppm; y en particular al añadirse en una concentración de 25 ppm.

Los polipéptidos de la presente invención deberían preferiblemente tener al menos el 20% de la actividad antimicrobiana del polipéptido consistiendo en la secuencia de aminoácidos mostrada como los aminoácidos 1 a 40 de la SEC ID NO:2. En una forma de realización particular preferida, los polipéptidos deberían tener al menos 40%, así como al menos el 50%, preferiblemente al menos el 60%, así como al menos el 70%, más preferiblemente al menos el 80%, así como al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, así como aproximadamente o al menos el 100% de la actividad antimicrobiana del polipéptido consistente en la secuencia de aminoácidos mostrada como los aminoácidos 1 a 40 de la SEC ID NO:2.

Identidad: En el presente contexto, la homología entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos está descrita por el parámetro “identidad”.

Para los fines de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el programa FASTA incluido en la versión 2.0x del paquete del programa FASTA (véase W. R. Pearson y D. J. Lipman (1988), “Improved Tools for Biological Sequence Analysis”, PNAS 85:2444-2448; y W. R. Pearson (1990) “Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA”, Methods in Enzymology 183:63-98). La matriz de puntuación usada fue BLOSUM50, la penalización de gap fue -12, y la penalización de la extensión de gaps fue -2.

El grado de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina usando el mismo algoritmo y paquete de software como se ha descrito anteriormente. La matriz de puntuación usada fue la matriz de la identidad, penalización de gaps fue -16, y penalización por la extensión de gaps fue -4.

Fragmento: Cuando se usa en la presente, un “fragmento” de la SEC ID NO:2 es un polipéptido que tiene uno o más aminoácidos delecionados del terminal amino y/o carboxilo de esta secuencia de aminoácidos.

Variante alélica: En el presente contexto, el término “variante alélica” se refiere a cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge naturalmente a través de la mutación, y puede resultar en un polimorfismo en las poblaciones. Las mutaciones del gen pueden ser silenciosas (sin cambios en el polipéptido codificado) o puede codificar polipéptidos con secuencias de aminoácidos alteradas. Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

Polinucleótido sustancialmente puro: El término “polinucleótido sustancialmente puro” según se utiliza en este caso se refiere a una preparación polinucleótida, donde el polinucleótido ha sido eliminado de su ambiente natural genético, y por lo tanto está libre de otras secuencias de codificación extrañas o indeseadas y está en una forma adecuada para el uso en los sistemas de producción de proteínas creadas genéticamente. Así, un polinucleótido sustancialmente puro contiene como mucho el 10% en peso de otro material polinucleótido con el cual está originalmente asociado (se prefieren porcentajes inferiores de otro material polinucleótido, p. ej. como mucho el 8% en peso, como mucho el 6% en peso, como mucho el 5% en peso, como mucho el 4% como mucho el 3% en peso, como mucho el 2% en peso, como mucho el 1% en peso, y como mucho 1/2% en peso). Un polinucleótido sustancialmente puro puede, no obstante, incluir regiones 5' y 3' no traducidas de origen natural, tales como promotores y terminadores. Se prefiere que el polinucleótido sustancialmente puro tenga al menos el 92% de pureza, es decir que el polinucleótido constituya al menos el 92% en peso del material polinucleótido total presente en la preparación, y se prefieren porcentajes más altos tales como al menos el 94% de pureza, al menos el 95% de pureza, al menos el 96% de pureza, al menos el 96% de pureza, al menos el 97% de pureza, al menos el 98% de pureza, al menos el 99%, y como mucho el 99.5% de pureza. Los polinucleótidos descritos aquí están preferiblemente en forma sustancialmente pura. En particular, se prefiere que los polinucleótidos descritos aquí estén en “forma esencialmente pura”, es decir que la preparación polinucleótida esté esencialmente libre de otro material polinucleótido con el cual esté originalmente asociada. Aquí, el término “polinucleótido sustancialmente puro” es sinónimo de los términos “polinucleótido aislado” y “polinucleótido en forma aislada”.

Modificación(es): En el contexto de la presente invención el término “modificación(es)” pretende significar cualquier modificación química del polipéptido consistente en la secuencia de aminoácidos mostrada como los aminoácidos 1 a 40 de la SEC ID NO:2 así como la manipulación genética del ADN que codifica este polipéptido. La(s) modificación(es) puede(n) ser una(s) reposición(es) de la(s) cadena(s) de aminoácidos, sustitución(es), delección(es) y/o inserción(es) dentro o en el(los) aminoácido(s) de interés.

Variante artificial: Cuando se usa aquí, el término “variante artificial” significa un polipéptido con actividad antimicrobiana, que ha sido producido por un organismo que expresa un gen modificado en comparación con la SEC ID NO:1. El gen modificado, a partir del cual dicha variante es producida cuando se expresa en un huésped adecuado, se obtiene mediante la intervención humana por modificación de la secuencia de nucleótidos descrita en la SEC ID NO:1.

ADNc: El término “ADNc” cuando se usa en el contexto presente, se destina a cubrir una molécula de ADN que puede ser preparada por transcripción inversa desde una molécula de ARNm madura, dividida, derivada de una célula eucariótica. El ADNc carece de las secuencias del intrón que están normalmente presentes en el ADN genómico correspondiente. El transcrito de ARN inicial primario es un precursor para ARNm y atraviesa una serie de eventos de tratamiento antes de aparecer como ARNm maduro y dividido. Estos eventos incluyen la eliminación de las secuencias del intrón por un proceso denominado de empalme. Cuando el ADNc deriva de ARNm carece como consecuencia de secuencias de intrones.

Constructo de ácidos nucleicos: Cuando se usa aquí, el término “constructo de ácidos nucleicos” significa una molécula de ácidos nucleicos, sea mono- o bicatenaria, que está aislada de un gen de origen natural o que ha sido modificada para contener segmentos de ácidos nucleicos de un modo que de lo contrario no existiría en la naturaleza. El término constructo de ácidos nucleicos es sinónimo del término “casete de expresión” cuando el constructo de ácidos nucleicos contiene las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia de codificación de la presente invención.

Secuencia de control: El término “secuencias de control” se define aquí por incluir todos los componentes, que son necesarios o ventajosos para la expresión de un polipéptido de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa o externa de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Tales secuencias de control incluyen, pero no se limitan a una secuencia líder, de poliadenilación, secuencia de propéptidos, promotor, secuencia del péptido señal, y terminador de la transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor, y señales de parada transcripcional y traduccional. Las secuencias de control pueden estar provistas de enlaces para la introducción de sitios de restricción específicos que facilitan la ligación de las secuencias de control con la región de codificación de la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido.

Operativamente enlazado: El término “operativamente enlazado” se define aquí como una configuración donde una secuencia de control está apropiadamente colocada en una posición relativa a la secuencia de codificación de la secuencia de ADN de manera que la secuencia de control dirige la expresión de un polipéptido.

Secuencia de codificación: Cuando se usa aquí el término “secuencia de codificación” se destina a cubrir una secuencia de nucleótidos, que directamente especifica la secuencia de aminoácidos de su producto proteínico. Los límites de la secuencia de codificación están generalmente determinados por un marco de lectura abierto, que normalmente se inicia con el codón de iniciación ATG. La secuencia de codificación normalmente incluye ADN, ADNc, y secuencias de nucleótidos recombinantes.

Expresión: En el contexto presente, el término “expresión” incluye cualquier fase implicada en la producción del polipéptido que incluye, pero no se limita a, la transcripción, la modificación postranscripcional, la traducción, la modificación postraduccional, y la secreción.

Vector de expresión: En el contexto presente, el término “vector de expresión” cubre una molécula de ADN, lineal o circular, que comprende una codificación del segmento un polipéptido de la invención, y que está operativamente enlazado a segmentos adicionales que proveen a su transcripción.

Célula huésped: El término “célula huésped”, como se utiliza en este caso, incluye cualquier tipo de célula que es susceptible de transformación con un constructo de ácidos nucleicos.

Los términos “sonda polinucleótida”, “hibridación” al igual que las distintas condiciones de astringencia están definidas en la sección titulada “Polipéptidos con actividad antimicrobiana”.

Descripción detallada

Polipéptidos con actividad antimicrobiana

En una primera forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos con actividad antimicrobiana y donde los polipéptidos comprenden, preferiblemente consisten en, una secuencia de aminoácidos con cierta identidad a los aminoácidos 1 a 40 de la SEC ID NO:2 (es decir, el polipéptido maduro) de al menos el 65%, preferiblemente de al menos el 70%, p. ej. al menos el 75%, más preferiblemente al menos el 80%, así como al menos el 85%, incluso más preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, p. ej. al menos el 96%, así como al menos el 97%, e incluso más preferiblemente al menos el 98%, así como al menos el 99% (de ahora en adelante “polipéptidos homólogos”). En una forma de realización interesante, la secuencia de aminoácidos difiere como mucho de diez aminoácidos (p. ej. de diez aminoácidos), en particular de como mucho cinco aminoácidos (p. ej. de cinco aminoácidos), así como de como mucho cuatro aminoácidos (p. ej. de cuatro aminoácidos), p. ej. de como mucho tres aminoácidos (p. ej. de tres aminoácidos) de los aminoácidos 1 a 40 de la SEC ID NO:2. En una forma de realización particular interesante, la secuencia de aminoácidos difiere de como mucho dos aminoácidos (p. ej. de dos aminoácidos), así como de un aminoácido de los aminoácidos 1 a 40 de la SEC ID NO:2.

Preferiblemente, los polipéptidos de la presente invención comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:2 o un fragmento de la misma que tiene actividad antimicrobiana. En otra forma de realización preferida, el polipéptido de la presente invención comprende los aminoácidos 1 a 40 de la SEC ID NO:2. En una forma de realización adicional preferida, el polipéptido consiste en los aminoácidos 1 a 40 de la SEC ID NO:2.

Los aminoácidos que componen el polipéptido de la invención pueden independientemente ser seleccionados de las formas D o L.

El polipéptido de la invención puede ser un polipéptido de tipo salvaje, que tiene actividad antimicrobiana, identificada y aislada de una fuente natural. Tales polipéptidos de tipo salvaje pueden ser específicamente seleccionados por técnicas estándar conocidas en la técnica. Además, el polipéptido de la invención puede ser preparado por la técnica de la redistribución de ADN, tal como está descrito en J.E. Ness *et al. Nature Biotechnology* **17**, 893-896 (1999).

Los presentes inventores han aislado un gen que codifica un polipéptido con actividad antibacteriana de *Pseudoplectanania nigrella*. La cepa de *Pseudoplectanania nigrella* que contiene el gen fue depositada según el Tratado de Budapest en el Reconocimiento Internacional de Depósitos de Microorganismos a los Fines del Procedimiento en materia de Patentes del 28 enero 1997 en el Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS), Uppsalalaan 8, 3584 CT Utrecht,

Holanda (de forma alternativa P.O.Box 85167,3508 AD Utrecht, Holanda), y se le designó el No. de acceso CBS 444.97.

En una tercera forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos con actividad antimicrobiana que son codificados por secuencias de nucleótidos que se hibridan bajo condiciones de astringencia media, más preferiblemente bajo condiciones de astringencia media-alta, incluso más preferiblemente condiciones de astringencia alta, y más preferiblemente bajo condiciones de astringencia muy alta con una sonda de polinucleótidos seleccionada del grupo que se compone por (i) la cadena complementaria de los nucleótidos 166 a 285 de la SEC ID NO:1, (ii) la cadena complementaria de la secuencia de ADNc contenida en los nucleótidos 70 a 285 de la SEC ID NO:1, y (iii) la cadena complementaria de los nucleótidos 1 a 285 de la SEC ID NO:1 (J. Sambrook, E.F. Fritsch, y T. Maniatus, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2d edition, Cold Spring Harbor, Nueva York).

La secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO:1 o una subsecuencia de la misma, al igual que la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:2 o un fragmento de la misma, puede ser usada para diseñar una sonda de polinucleótidos para identificar y clonar el ADN que codifica los polipéptidos con actividad antimicrobiana de cepas de diferentes géneros o especies según métodos bien conocidos en la técnica. En particular, tales sondas pueden ser usadas para hibridación con el ADNc o genómico del género o especies de interés, según procedimientos de Southern blot estándares, para identificar y aislar el gen correspondiente en las mismas. Tales sondas pueden ser considerablemente más cortas que la secuencia entera, pero deberían tener al menos 15, preferiblemente al menos 25, más preferiblemente al menos 35 nucleótidos de longitud, así como al menos 70 nucleótidos de longitud. No obstante, se prefiere que la sonda de polinucleótidos tenga al menos 100 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, la sonda de polinucleótidos puede tener al menos 200 nucleótidos de longitud, al menos 300 nucleótidos de longitud, al menos 400 nucleótidos de longitud o al menos 500 nucleótidos de longitud. Se pueden usar sondas incluso más largas, p. ej., sondas de polinucleótidos que tienen al menos 600 nucleótidos de longitud, al menos 700 nucleótidos de longitud, al menos 800 nucleótidos de longitud, o al menos 900 nucleótidos de longitud. Ambas sondas de ADN y ARN pueden ser usadas. Las sondas están normalmente marcadas para detectar el gen correspondiente (por ejemplo, con ^{32}P , ^3H , ^{35}S , biotina, o avidina).

Así, un ADN genómico o biblioteca de ADNc preparados a partir de estos otros organismos pueden ser seleccionados por el ADN que se hibrida con las sondas anteriormente descritas y que codifica un polipéptido con actividad antimicrobiana. El ADN genómico u otro de tales otros organismos pueden ser separados por electroforesis en gel de poliacrilamida o agarosa, u otras técnicas de separación. El ADN de las bibliotecas o el ADN separado puede ser transferido a, e inmovilizado, en nitrocelulosa u otros materiales portadores adecuados. Para identificar un clon o ADN que sea homólogo a la SEC ID NO: 1 el material portador con el ADN inmovilizado es utilizado en un Southern blot.

Para los fines de la presente invención, la hibridación indica que la secuencia de nucleótidos se hibrida en una sonda de polinucleótidos marcada que se hibrida en la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID NO:1 bajo condiciones de astringencia de muy baja a muy alta. Las moléculas en las que la sonda de polinucleótidos se hibrida bajo estas condiciones pueden ser detectadas usando una película radiográfica o por cualquier otro método conocido en la técnica. Siempre que el término "sonda de polinucleótidos" se usa en el presente contexto, debe entenderse que tal sonda contiene al menos 15 nucleótidos.

En una forma de realización interesante, la sonda de polinucleótidos es la cadena complementaria de los nucleótidos 166 a 285, los nucleótidos 70 a 285, o los nucleótidos 1 a 285 de la SEC ID NO:1.

En otra forma de realización interesante, la sonda de polinucleótidos es la cadena complementaria de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la SEC ID NO:2. En una forma de realización adicional interesante, la sonda de polinucleótidos es la cadena complementaria de la SEC ID NO:1. En otra forma de realización adicional interesante, la sonda de polinucleótidos es la cadena complementaria de la zona de codificación del polipéptido maduro de la SEC ID NO:1.

Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, las condiciones de astringencia de muy bajas a muy altas están definidas como prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 1.0% SDS, 5X Solución de Denhardt, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, según procedimientos de Southern blot estándares. Preferiblemente, las sondas largas de al menos 100 nucleótidos no contienen más de 1000 nucleótidos. Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, el material portador es finalmente lavado tres veces cada vez durante 15 minutos usando 2 X SSC, 0.1% de SDS a 42°C (astringencia muy baja), preferiblemente lavado tres veces cada vez durante 15 minutos usando 0.5 X SSC, 0.1% de SDS a 42°C (astringencia baja), más preferiblemente lavado tres veces cada vez durante 15 minutos usando 0.2 X SSC, 0.1% de SDS a 42°C (astringencia media), incluso más preferiblemente lavado tres veces cada vez durante 15 minutos usando 0.2 X SSC, 0.1% de SDS a 55°C (astringencia media-alta), más preferiblemente lavado tres veces cada vez durante 15 minutos usando 0.1 X SSC, 0.1% de SDS a 60°C (astringencia alta), en particular es lavado tres veces cada vez durante 15 minutos usando 0.1 X SSC, 0.1% de SDS a 68°C (astringencia muy alta).

Aunque no es particularmente preferido, se contempla que sondas más cortas, p. ej. sondas que tienen aproximadamente de 15 a 99 nucleótidos de longitud, así como de aproximadamente 15 a aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, pueden también ser usadas. Para este tipo de sondas cortas, se definen las condiciones de astringencia como prehibridación, hibridación, y lavado post-hibridación a 5°C hasta 10°C por debajo de la T_m calculada usando el cálculo según Bolton y McCarthy (1962, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 48:1390) en 0.9 M de NaCl

ES 2 275 011 T3

0.09 M de tris-HCl pH 7.6, 6 mM de EDTA, 0.5% de NP-40, 1X Solución de Denhardt, 1 mM de pirofosfato de sodio, 1 mM de fosfato de sodio monobásico, 0.1 mM de ATP, y 0.2 mg de ARN de levadura por ml según procedimientos de Southern blot estándares.

- 5 Para sondas cortas que tienen aproximadamente de 15 nucleótidos a 99 nucleótidos de longitud, el material portador es lavado una vez en 6X SSC más 0.1% SDS durante 15 minutos y dos veces cada vez durante 15 minutos usando 6X SSC a 5°C a 10°C por debajo de la T_m calculada.

Extensión N-terminal

- 10 Una extensión N-terminal puede de manera adecuada consistir en 1 a 50 aminoácidos, preferiblemente 2-20 aminoácidos, especialmente 3-15 aminoácidos. En una forma de realización, la extensión del péptido N-terminal no contiene Arg (R). En otra forma de realización la extensión N-terminal comprende un sitio de seccionamiento kex2 o del tipo kex2 como será definido adicionalmente más abajo. En una forma de realización preferida la extensión N-terminal es un péptido, que comprende al menos dos residuos aminoácidos Glu (E) y/o Asp (D), tales como una extensión N-terminal que comprende una de las siguientes secuencias: EAE, EE, DE, DD.

Sitios Kex2

- 20 Los sitios Kex2 (ver, p. ej., Methods in Enzymology Vol 185, ed. D. Goeddel, Academic Press Inc. (1990), San Diego, CA, "Gene Expression Technology") y los sitios del tipo kex2 son sitios de reconocimiento dibásicos (es decir, sitios de seccionamiento) que se encuentran entre la región de codificación del pro-péptido y la región madura de algunas proteínas.

- 25 La inserción de un sitio kex2 o un sitio del tipo kex2 han demostrado en algunos casos que mejoran el tratamiento de la endopeptidasa correcta en el sitio de seccionamiento pro-péptido dando como resultado unos niveles de secreción de proteínas aumentados.

- 30 En el contexto de la invención, la inserción de un sitio kex2 o del tipo kex2 supone la posibilidad de obtener el seccionamiento a una posición determinada en la extensión N-terminal dando como resultado un polipéptido antimicrobiano que se extiende en comparación con el polipéptido maduro mostrado como los aminoácidos 1 a 40 de la SEC ID NO:2.

Fuentes para polipéptidos con actividad antimicrobiana

- 35 Un polipéptido de la presente invención puede ser obtenido a partir de microorganismos de cualquier género. Para objetivos de la presente invención, el término "obtenido a partir de" como se utiliza en este caso significará que el polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos es producido por una célula donde la secuencia de nucleótidos está naturalmente presente o en la que se ha insertado la secuencia de nucleótidos. En una forma de realización preferida, el polipéptido es segregado extracelularmente.

- 40 Un polipéptido de la presente invención puede ser un polipéptido bacteriano. Por ejemplo, el polipéptido puede ser un polipéptido bacteriano gram positivo tal como un polipéptido de *Bacillus*, p. ej., un polipéptido de *Bacillus aliphilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, o *Bacillus thuringiensis*; o un polipéptido de *Streptomyces*, p. ej., un polipéptido de *Streptomyces lividans* o *Streptomyces murinus*; o un polipéptido bacteriano gram negativo, p. ej., un polipéptido de *E. coli* o de *Pseudomonas* sp.

- 50 Un polipéptido de la presente invención puede ser un polipéptido fúngico, y más preferiblemente un polipéptido de levadura tal como un polipéptido de *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Yarrowia*; o más preferiblemente un polipéptido filamentoso fúngico tal como un polipéptido de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Piromyces*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium* o *Trichoderma*.

- 55 En una forma de realización interesante, el polipéptido es un polipéptido de *Saccharomyces carisbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis* o *Saccharomyces oviformis*.

- 60 En otra forma de realización interesante, el polipéptido es un polipéptido de *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochromum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, o *Trichoderma viride*.

En una forma de realización preferida, el polipéptido es un polipéptido de *Pseudoplectania nigrella*, y más preferiblemente un polipéptido de CBS 444.97 de *Pseudoplectania nigrella*, p. ej., el polipéptido consistente en la secuencia de aminoácidos 1 a 40 de la SEC ID NO:2.

5 Debe ser entendido que para las especies mencionadas, la invención comprende tanto los estados perfectos como imperfectos, y otros equivalentes taxonómicos, p. ej., anamorfos, a pesar del nombre de la especie por el que son conocidos. Los expertos en la técnica fácilmente reconocen la identidad de los equivalentes apropiados.

10 Las cepas de estas especies son fácilmente accesibles al público en un varias colecciones de cultivos, tales como la American Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS), y la Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

15 Además, tales polipéptidos pueden ser identificados y obtenidos a partir de otras fuentes incluyendo microorganismos aislados de la naturaleza (p. ej., suelo, composts, agua, etc.) usando las sondas mencionadas más arriba. Las técnicas para aislar microorganismos de sus hábitats naturales son bien conocidas en la técnica. La secuencia de nucleótidos puede luego ser derivada mediante la selección de forma similar de una biblioteca genómica o de ADNc de otro microorganismo. Una vez detectada una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con la(s) sonda(s), la secuencia puede ser aislada o donada utilizando técnicas que son conocidas por los expertos en la técnica (ver, p. 20 ej., Sambrook *et Al.*, 1989, *supra*).

Los polipéptidos codificados por las secuencias de nucleótidos de la presente invención también incluyen polipéptidos fusionados o polipéptidos de fusión divisibles en los que otro polipéptido es fusionado en el N-término o en el C-término del polipéptido o fragmento del mismo. Un polipéptido fusionado es producido fusionando una secuencia de nucleótidos (o una parte de la misma) que codifica otro polipéptido hasta una secuencia de nucleótidos (o una parte de la misma) de la presente invención. Las técnicas para producir polipéptidos de fusión son conocidas en la técnica, e incluyen ligar las secuencias de codificación que codifican los polipéptidos de modo que éstos estén en un marco y que la expresión del polipéptido fusionado esté bajo control del(los) mismo(s) promotor(es) y 25 terminador.

30 *Secuencias de polinucleótidos y de nucleótidos*

La presente invención también se refiere a polinucleótidos que tienen una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido de la invención. En particular, la presente invención se refiere a polinucleótidos que consisten en una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido de la invención. En una forma de realización preferida, la secuencia de nucleótidos se establece en la SEC ID NO:1. En una forma de realización más preferida, la secuencia de nucleótidos es la región de codificación del polipéptido maduro de la SEC ID NO:1. La presente invención también comprende polinucleótidos que tienen, preferiblemente que consisten en, secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:2 o el polipéptido maduro de la misma, que difiere de la SEC ID NO:1 en virtud de la degeneración del código genético. 35 40

La presente invención también se refiere a polinucleótidos que tienen, preferiblemente que consisten en, una subsecuencia de la SEC ID NO:1 que codifica fragmentos de la SEC ID NO:2 que tienen actividad antimicrobiana. Una subsecuencia de la SEC ID NO:1 es una secuencia de nucleótidos comprendida por la SEC ID NO:1 excepto porque uno o más nucleótidos del extremo 5' y/o 3' han sido delecionados. 45

La presente invención también se refiere a polinucleótidos que tienen, preferiblemente que consisten en, una secuencia de nucleótidos modificada que comprende al menos una modificación en la secuencia de codificación del polipéptido maduro de la SEC ID NO:1, y donde la secuencia de nucleótidos modificada codifica un polipéptido que consiste en los aminoácidos 1 a 40 de la SEC ID NO:2. 50

Las técnicas usadas para aislar o donar una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido son conocidas en la técnica e incluyen el aislamiento del ADN genómico, la preparación a partir de ADNc, o una combinación de éstas. La clonación de las secuencias de nucleótidos de la presente invención a partir de este ADN genómico puede ser efectuada, p. ej., usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) bien conocida o seleccionando anticuerpos de bibliotecas de expresión para detectar fragmentos de ADN donados con características estructurales compartidas. Ver, p. ej., Innis *et al.*, 1990, PCR: A Guide to Methods and Application, Academic Press, New York. Otros procedimientos de amplificación tales como la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la transcripción activada ligada (LAT) y la amplificación a base de secuencias de nucleótidos (NASBA) pueden ser usados. La secuencia de nucleótidos puede ser donada a partir de una cepa de una secuencia de nucleótidos que codifica polipéptidos antimicrobianos presente en *Pseudoplectania*, u otro organismo o uno relacionado y así, por ejemplo, puede ser una variante alélica o variante de especies de la región de codificación de polipéptidos de la secuencia de nucleótidos. 55 60

La secuencia de nucleótidos puede ser obtenida por procedimientos de donación estándares usados en ingeniería genética para recolocar la secuencia de nucleótidos desde su ubicación natural a un sitio diferente donde será reproducida. Los procedimientos de clonación pueden comprender la escisión y aislamiento de un fragmento deseado que comprenda la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido, la inserción del fragmento en una molécula del vector, y la incorporación del vector recombinante en una célula huésped donde se replicarán las copias múltiples 65

o clones de la secuencia de nucleótidos. La secuencia de nucleótidos puede ser de origen genómico, ADNc, ARN, semisintético, sintético, o cualquier combinación de los mismos.

La presente invención también se refiere a un polinucleótido que tiene, preferiblemente que consiste en, una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 65% de identidad con los nucleótidos 166 a 285 de la SEC ID NO:1. Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos tiene al menos el 70% de identidad, p. ej. al menos el 80% de identidad, así como al menos el 90% de identidad, más preferiblemente al menos el 95% de identidad, así como al menos el 96% de identidad, p. ej. al menos el 97% de identidad, incluso más preferiblemente al menos el 98% de identidad, así como al menos el 99% con los nucleótidos 166 a 285 de la SEC ID NO:1. Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido con actividad antimicrobiana. El grado de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina según se ha descrito previamente (véase la sección titulada "Definiciones"). Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos comprende los nucleótidos 166 a 285 de la SEC ID NO:1. En una forma de realización aún más preferida, la secuencia de nucleótidos consiste en los nucleótidos 166 a 285 de la SEC ID NO:1.

La modificación de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser necesaria para la síntesis de un polipéptido, comprendiendo una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una sustitución, delección y/o inserción en comparación con los aminoácidos 1 a 40 de la SEC ID NO:2. Estas variantes artificiales pueden diferir en cierto modo creado genéticamente del polipéptido aislado de su fuente nativa, p. ej., las variantes que difieren en cuanto a la actividad específica, termostabilidad, pH óptimo, o similar.

Será evidente para los expertos en la técnica que tales modificaciones pueden hacerse fuera de las regiones fundamentales para la función de la molécula y además resultan en un polipéptido activo. Los residuos aminoácidos esenciales para la actividad del polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos de la invención, y en consecuencia preferiblemente no sometido a una modificación, así como una sustitución, pueden ser identificados según procedimientos conocidos en la técnica, tales como la mutagénesis sitio dirigida o la mutagénesis de barrido de alanina (véase, p. ej., Cunningham and Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085). En ésta técnica, las mutaciones son introducidas en cada residuo cargado positivamente en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes son evaluadas por su actividad antimicrobiana para identificar los residuos aminoácidos que son fundamentales para la actividad de la molécula. Los sitios de interacción enzima-sustrato pueden también ser determinados por análisis de la estructura tridimensional según está determinado por técnicas tales como el análisis de resonancia magnética nuclear, cristalografía o el marcado por fotoafinidad (véase, p. ej., de Vos *et al.*, 1992, *Science* 255: 306-312; Smith *et al.*, 1992, *Journal of Molecular Biology* 224: 899-904; Wiodaver *et al.*, 1992, *FEBS Letters* 309: 59-64).

Además, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser modificada por introducción de sustituciones de nucleótidos sin dar lugar a otra secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos, pero que corresponde al uso del codón del organismo huésped destinado a la producción de la enzima.

La introducción de una mutación en la secuencia de nucleótidos para intercambiar un nucleótido por otro nucleótido puede ser realizada por mutagénesis sitio-dirigida usando cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. Es particularmente útil el procedimiento, que utiliza un vector de ADN bicatenario superenrollado con un inserto de interés y dos cebadores sintéticos conteniendo la mutación deseada. Los cebadores oligonucleótidos, cada uno complementario a las cadenas opuestas del vector, se extienden durante el ciclado de la temperatura mediante *Pfu* ADN polimerasa. Con la incorporación de los cebadores, se genera un plásmido mutado que contiene cortes en bisel. Después del ciclado de la temperatura, el producto es tratado con *DpnI* que es específico para ADN metilado y hemimetilado para digerir el molde de ADN parental y para seleccionar el ADN sintetizado conteniendo la mutación. Otros procedimientos conocidos pueden también ser usados en la técnica. Para una descripción general sobre la sustitución de nucleótidos, véase, p. ej., Ford *et al.*, 1991, *Protein Expression and Purification* 2: 95-107.

La presente invención también se refiere a un polinucleótido que tiene, preferiblemente que consiste en, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad antimicrobiana, y que se hibrida bajo condiciones de astringencia muy baja, preferiblemente bajo condiciones de astringencia baja, más preferiblemente bajo condiciones de astringencia media, más preferiblemente bajo condiciones de astringencia media-alta, incluso más preferiblemente bajo condiciones de astringencia alta, y más preferiblemente bajo condiciones de astringencia muy alta con una sonda de polinucleótidos seleccionada del grupo que consiste en (i) la cadena complementaria de los nucleótidos 166 a 285 de la SEC ID NO:1, (ii) la cadena complementaria de la secuencia de ADNc contenida en los nucleótidos 70 a 285 de la SEC ID NO:1, y (iii) la cadena complementaria de los nucleótidos 1 a 285 de la SEC ID NO:1.

Como se entenderá, los detalles y particularidades en cuanto a la hibridación de las secuencias de nucleótidos serán iguales o análogos a los aspectos de la hibridación discutidos en la sección titulada "Polipéptidos con actividad antimicrobiana" en la presente.

Constructos de ácidos nucléicos

La presente invención también se refiere a constructos de ácidos nucléicos que comprenden una secuencia de nucleótidos de la presente invención operativamente enlazada a una o más secuencias de control que dirige(n) la expresión de la secuencia de codificación en una célula huésped adecuada bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

Una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser manipulada de varias maneras para proporcionar la expresión del polipéptido. La manipulación de la secuencia de nucleótidos antes de su inserción en un vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para modificar secuencias de nucleótidos utilizando métodos de ADN recombinante son bien conocidos en la técnica.

La secuencia de control puede ser una secuencia promotora apropiada, una secuencia de nucleótidos que es reconocida por una célula huésped para la expresión de la secuencia de nucleótidos. La secuencia promotora contiene secuencias de control transcripcionales, que median la expresión del polipéptido. El promotor puede ser cualquier secuencia de nucleótidos que muestra actividad transcripcional en la célula huésped de elección incluyendo promotores, mutantes, truncados e híbridos, y puede ser obtenido a partir de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares bien homólogos o heterólogos a la célula huésped.

Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácidos nucleicos de la presente invención, especialmente en una célula huésped bacteriana, son los promotores obtenidos a partir del operón *lac* de *E. coli*, del gen de la agarasa (*dagA*) de *Streptomyces elicolor*, del gen de la levansucrasa (*sacB*) de *Bacillus subtilis*, del gen de la alfa-amilasa (*amyL*) de *Bacillus licheniformis*, del gen de la amilasa maltogénica (*amyM*) de *Bacillus stearothermophilus*, del gen de la alfa-amilasa (*amyQ*) de *Bacillus amyloliquefaciens*, del gen de la lactamasa (*penP*) de *Bacillus licheniformis*, de los genes *xylA* y *xylB* de *Bacillus subtilis*, y del gen de la beta-lactamasa procariótica (Villa-Kamaroff *et al.*, 1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 75: 3727-3731), al igual que el promotor *tac* (DeBoer *et al.*, 1983, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 80: 21-25). Otros promotores están descritos en "Useful proteins from recombinant bacteria" en *Scientific American*, 1980, 242: 74-94; y en Sambrook *et al.*, 1989, *supra*.

Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácidos nucleicos de la presente invención en una célula huésped filamentosa fúngica son promotores obtenidos de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, alfa-amilasa neutra de *Aspergillus Niger*, alfa-amilasa estable ácida de *Aspergillus Niger*, glucoamilasa (*glaA*) de *Aspergillus Niger* o de *Aspergillus awamori*, lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*, acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, y proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), al igual que el promotor NA2-tpi (un híbrido de los promotores de los genes para alfa-amilasa neutra de *Aspergillus Niger* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*), y, promotores mutantes, truncados e híbridos de los mismos.

En un huésped de la levadura, los promotores útiles son obtenidos a partir de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), galactocinasa (GAL1) de *Saccharomyces cerevisiae*, alcohol deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (ADH2/GAP), y 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros promotores útiles para células huéspedes de la levadura están descritos por Romanos *et al.*, 1992, *Yeast* 8: 423-488.

La secuencia de control puede también ser una secuencia de terminación de la transcripción adecuada, una secuencia reconocida por una célula huésped para terminar la transcripción. La secuencia de terminación está operativamente enlazada al termino 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Cualquier terminador que es funcional en la célula huésped de elección puede ser usada en la presente invención.

Los terminadores preferidos para las células huéspedes filamentosas fúngicas son obtenidos a partir de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*, y proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.

Los terminadores preferidos para células huéspedes de la levadura son obtenidos a partir de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, citocromo C (CYC1) de *Saccharomyces cerevisiae*, y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros terminadores útiles para células huéspedes de la levadura están descritas por Romanos *et al.*, 1992, *supra*.

La secuencia de control puede también ser una secuencia líder adecuada, una región no traducida de un ARNm que es importante para la traducción por la célula huésped. La secuencia líder está operativamente enlazada al termino 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Cualquier secuencia líder que sea funcional en la célula huésped de elección puede ser usada en la presente invención.

Los líderes preferidos para células huéspedes filamentosas fúngicas son obtenidos a partir de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

Los líderes adecuados para células huéspedes de la levadura son obtenidos a partir de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae*, y alcohol deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (ADH2/GAP).

La secuencia de control puede también ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia operativamente enlazada al termino 3' de la secuencia de nucleótidos y que, cuando es transcrita, es reconocida por la célula huésped como

una señal para añadir residuos de poliadenosina al ARNm transcrito. Cualquier secuencia de poliadenilación que es funcional en la célula huésped de elección puede ser usada en la presente invención.

Las secuencias de la poliadenilación preferidas para células huéspedes filamentosas fúngicas son obtenidas a partir de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*, y alfa-glucosidasa de *Aspergillus Niger*.

Las secuencias de la poliadenilación útiles para células huéspedes de la levadura están descritas por Guo y Sherman, 1995, *Molecular Cellular Biology* 15: 5983-5990.

La secuencia de control puede también ser una zona de codificación del péptido señal que codifica para una secuencia de aminoácidos enlazada al termino amino de un polipéptido y dirige al polipéptido codificado en la vía segregadora de la célula. El extremo 5' de la secuencia de codificación de la secuencia de nucleótidos puede intrínsecamente contener una zona de codificación del péptido señal enlazada de forma natural en el marco de lectura de la traducción con el segmento de la región de codificación que codifica el polipéptido segregado. De forma alternativa, el extremo 5' de la secuencia de codificación puede contener una región de codificación del péptido señal que es externa a la secuencia de codificación. La región de codificación del péptido señal externa puede ser requerida cuando la secuencia de codificación no contiene de forma natural una región de codificación del péptido señal. De forma alternativa, la región de codificación del péptido señal externa puede simplemente reemplazar la región de codificación del péptido señal natural para aumentar la secreción del polipéptido. No obstante, cualquier región de codificación del péptido señal que dirige al polipéptido expresado a la vía segregadora de una célula huésped de elección puede ser usada en la presente invención.

La región de codificación del péptido señal son los nucleótidos 1 a 69 de la SEC ID NO:1 que codifican los aminoácidos -55 a -33 de la SEC ID NO:2 (o los aminoácidos 1 a 23 de la SEC ID NO:3).

Las regiones de codificación del péptido señal eficaces para las células huéspedes bacterianas son las regiones de codificación del péptido señal obtenidas a partir de los genes para amilasa maltogénica de NCIB 11837 de *Bacillus*, alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, subtilisina de *Bacillus licheniformis*, beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis*, proteasas neutras (*nprT*, *nprS*, *nprM*) de *Bacillus stearothermophilus*, y *prsA* de *Bacillus subtilis*. Además los péptidos señal están descritos por Simonen y Palva, 1993, *Microbiological Reviews* 57: 109-137.

Las regiones de codificación del péptido señal eficaces para células huéspedes filamentosas fúngicas son las regiones de codificación del péptido señal obtenidas a partir de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, amilasa neutra de *Aspergillus Niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, celulasa de *Humicola insolens*, y lipasa de *Humicola lanuginosa*.

Los péptidos señal útiles para células huéspedes de la levadura son obtenidos a partir de los genes para el alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae* y la invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otras regiones de codificación del péptido señal útiles están descritas por Romanos *et al.*, 1992, *supra*.

La secuencia de control puede también ser una región de codificación del propéptido que codifica para una secuencia de aminoácidos situada en el término amino de un polipéptido. El polipéptido resultante es conocido como una proenzima o propolipéptido (o un zimógeno en algunos casos). Un propolipéptido es generalmente inactivo y puede ser convertido a un polipéptido maduro activo por seccionamiento catalítico o autocatalítico del propéptido del propolipéptido. La región de codificación del propéptido puede ser obtenida a partir de los genes para proteasa alcalina (*aprE*) de *Bacillus subtilis*, aeromonolisina (*nprT*) de *Bacillus subtilis*, alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, y lacasa de *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836).

La región de codificación del propéptido son los nucleótidos 70 a 165 de la SEC ID NO:1 que codifican los aminoácidos -32 a -1 de la SEC ID NO:2 (o los aminoácidos 24 a 55 de la SEC ID NO:3).

Cuando tanto el péptido señal como las regiones del propéptido están presentes en el término amino de un polipéptido, la región del propéptido se sitúa junto al término amino de un polipéptido y la región del péptido señal se sitúa junto al término amino de la región del propéptido.

Puede también ser deseable añadir secuencias reguladoras que permitan la regulación de la expresión del polipéptido con respecto al crecimiento de la célula huésped. Ejemplos de sistemas reguladores son los que provocan que la expresión del gen se active o desactive en respuesta a un estímulo químico o físico, incluyendo la presencia de un compuesto regulador. Los sistemas reguladores en sistemas procarióticos incluyen los sistemas de los operadores *lac*, *tac*, y *trp*. En la levadura, se puede usar el sistema ADH2 o sistema GAL1. En hongos filamentosos, el promotor TAKA alfa-amilasa, el promotor de la glucoamilasa de *Aspergillus niger*, y el promotor de la glucoamilasa de *Aspergillus oryzae* pueden ser usados como secuencias reguladoras. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son aquellas que permiten la amplificación del gen. En los sistemas eucarióticos, éstas incluyen el gen de la dihidrofolato-reductasa que es amplificado en presencia de metotrexato, y los genes de la metalotioneína que son amplificados con metales pesados. En estos casos, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido sería operativamente enlazada con la secuencia reguladora.

Vectores de expresión

La presente invención también se refiere a vectores de expresión recombinantes que comprenden el constructo de ácidos nucleicos de la invención. Las distintas secuencias de nucleótidos y de control anteriormente descritas pueden ser unidas entre sí para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o sustitución de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido en tales sitios. De forma alternativa, la secuencia de nucleótidos de la presente invención puede ser expresada insertando la secuencia de nucleótidos o un constructo de ácidos nucleicos que comprende la secuencia en un vector apropiado para la expresión. Al crear el vector de expresión, la secuencia de codificación está localizada en el vector de modo que la secuencia de codificación está operativamente enlazada con las secuencias de control apropiadas para la expresión.

El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (p. ej., un plásmido o virus) que puede ser convenientemente sometido a procedimientos de ADN recombinante y puede provocar la expresión de la secuencia de nucleótidos. La elección del vector normalmente dependerá de la compatibilidad del vector con la célula huésped en la que se introduzca el vector. Los vectores pueden ser plásmidos lineales o cerrados circulares.

El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, p. ej., un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma, o un cromosoma artificial.

El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. De forma alternativa, el vector puede ser uno que, introducido en la célula huésped, se integre en el genoma y se replique con el(los) cromosoma(s) donde se ha integrado. Además, se puede usar un único vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ADN total para ser introducido en el genoma de la célula huésped, o un transposón.

Los vectores de la presente invención preferiblemente contienen uno o más marcadores seleccionables que permiten seleccionar fácilmente las células transformadas. Un marcador seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia biocida o vírica, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos, y similares.

Ejemplos de marcadores bacterianos que se pueden seleccionar son los genes *dal* de *Bacillus subtilis* o *Bacillus licheniformis*, o marcadores que confieren resistencia antibiótica como resistencia a la ampicilina, canamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Marcadores adecuados para células huéspedes de la levadura son ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1, y URA3. Los marcadores seleccionables para el uso en una célula huésped filamentosa fúngica incluyen, pero no se limitan a, *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina-carbamoiltransferasa), *bar* (fosfinotricina acetiltransferasa), *hygB* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrato reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato-descarboxilasa), *sC* (sulfato adeniltransferasa), *trpC* (antranilato sintasa), así como equivalentes de los mismos.

Para el uso en una célula de *Aspergillus* se prefieren los genes *amdS* y *pyrG* de *Aspergillus nidulans* o de *Aspergillus oryzae* y el gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*.

Los vectores de la presente invención preferiblemente contienen un(os) elemento(s) que permite(n) la integración estable del vector en el genoma de la célula huésped o la replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.

Para la integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede depender de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido o cualquier otro elemento del vector para la integración estable del vector en el genoma por recombinación homóloga o no homóloga. De forma alternativa, el vector puede contener secuencias de nucleótidos adicionales para dirigir la integración por recombinación homóloga en el genoma de la célula huésped. Las secuencias de nucleótidos adicionales permiten que el vector sea integrado en el genoma de la célula huésped en una(s) ubicación(es) precisa(s) en el cromosoma(s). Para aumentar la probabilidad de integración en una ubicación precisa, los elementos integracionales deberían preferiblemente contener un número suficiente de nucleótidos, tal como de 100 a 1,500 pares de bases, preferiblemente 400 a 1,500 pares de bases, y más preferiblemente 800 a 1,500 pares de bases, que sean muy homólogas a la secuencia diana correspondiente para aumentar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos integracionales pueden ser cualquier secuencia que sea homóloga a la secuencia diana en el genoma de la célula huésped. Además, los elementos integracionales pueden ser secuencias de nucleótidos codificantes o no codificantes. En cambio, el vector puede ser integrado en el genoma de la célula huésped por recombinación no homóloga.

Para la replicación autónoma, el vector puede además comprender un origen de replicación que permita que el vector se replique de manera autónoma en la célula huésped en cuestión. Ejemplos de orígenes de replicación bacterianos son los orígenes de replicación de los plásmidos pBR322; pUC19; pACYC177, y pACYC184 que permiten la replicación en *E. coli*, y pUB110; pE194; pTA1060, y pAM 1 que permiten la replicación en *Bacillus*. Ejemplos de orígenes de replicación para el uso en una Célula huésped de la levadura son el origen de replicación de 2 micrones, ARS1, ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3, y la combinación de ARS4 y CENE. El origen de replicación puede ser uno que tenga una mutación que haga que su funcionamiento sea termosensible en la célula huésped (ver, p. ej., Ehrlich, 1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 75: 1433).

Se puede insertar más de una copia de una secuencia de nucleótidos de la presente invención en la célula huésped para aumentar la producción del producto genético. Un aumento en el número de copias de la secuencia de nucleótidos

puede ser obtenido integrando al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped o mediante la inclusión de un gen marcador seleccionable y amplificable con la secuencia de nucleótidos en la que las células que contienen copias amplificadas del gen marcador seleccionable, y por lo tanto las copias adicionales de la secuencia de nucleótidos, pueden ser seleccionadas para cultivar las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

Los procedimientos usados para enlazar los elementos anteriormente descritos al constructo de los vectores de expresión recombinantes de la presente invención son conocidos por los expertos en la técnica (ver, p. ej., Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

Células huéspedes

La presente invención también se refiere a una célula huésped recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos de la invención, que se utiliza ventajosamente en la producción recombinante de los polipéptidos. Un vector que comprende una secuencia de nucleótidos de la presente invención es introducido en una célula huésped de modo que el vector es mantenido como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico autorreplicante como se ha descrito antes.

La célula huésped puede ser un microorganismo unicelular, p. ej., un procariota, o un microorganismo no unicelular, p. ej., un eucariota.

Las células unicelulares útiles son células bacterianas tales como bacterias gram positivas que incluyen, pero no se limitan a, una célula de *Bacillus*, p. ej., *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, y *Bacillus thuringiensis*; o una célula de *Streptomyces*, p. ej., *Streptomyces lividans* o *Streptomyces murinus*, o bacterias gram negativas tales como *E. coli* y *Pseudomonas sp.* En una forma de realización preferida, la célula huésped bacteriana es una célula de *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus*, o *Bacillus subtilis*. En otra forma de realización preferida, la célula de *Bacillus* es un *Bacillus* alcalofílico.

La introducción de un vector en una célula huésped bacteriana puede, por ejemplo, ser efectuada por transformación del protoplasto (véase, p. ej., Chang y Cohen, 1979, *Molecular General Genetics* 168: 111-115), usando células competentes (véase, p. ej., Young and Spizizin, 1961, *Journal of Bacteriology* 81:823-829, o Dubnau y Davidoff-Abelson, 1971, *Journal of Molecular Biology* 56: 209-221), electroporación (véase p.ej., Shigekawa and Dower, 1988, *Biotechniques* 6: 742-751), o conjugación (véase p. ej. Koehler and Thorne, 1987, *Journal of Bacteriology* 169: 5771-5278).

La célula huésped puede ser una eucariota, como una célula de mamífero, de insecto, de planta, o fúngica.

En una forma de realización preferida, la célula huésped es una célula fúngica. “Fungi” como se utiliza en este caso incluye el phyla Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, y Zygomycota (tal y como se define por Hawkswort *et Al.*, En, *Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi*, 8th edition, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, Reino Unido) al igual que el Oomycota (según se cita en Hawkswort *et Al.*, 1995, *supra*, página 171) y todos los hongos mitospóricos (Hawkswort *et al.*, 1995, *supra*).

En una forma de realización más preferida, la célula huésped fúngica es una célula de levadura. “Levadura” según se utiliza en este caso incluye levadura ascosporigénea (Endomycetales), levadura basidiosporogénea, y levadura perteneciente a los “Fungi Imperfecti” (Blastomycetes). Puesto que la clasificación de la levadura puede cambiar en el futuro, para los fines de esta invención, la levadura será definida como se describe en *Biology and Activities of Yeast* (Skinner, F.A., Passmore, S.M., and Davenport, R.R., eds, *Soc. App. Bacteriol. Symposium Series No. 9*, 1980).

En una forma de realización aún más preferida, la célula huésped de la levadura es una célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o *Yarrowia*.

En una forma de realización más preferida, la célula huésped de la levadura es una célula de *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis* o *Saccharomyces oviformis*. En otra forma de realización más preferida, la célula huésped de la levadura es una célula de *Kluyveromyces lactis*. En otra forma de realización más preferida, la célula huésped de la levadura es una célula de *Yarrowia lipolytica*.

En otra forma de realización más preferida, la célula huésped fúngica es una célula fúngica filamentosa. “Hongos filamentosos” incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycota y Oomycota (tal y como se define por Hawkswort *et al.*, 1995, *supra*). Los hongos filamentosos están caracterizados porque una pared micelial compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano, y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo se realiza por alargamiento hifal y el catabolismo del carbono es estrictamente aeróbico. Por el contrario, el crecimiento vegetativo por levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* se realiza por injerto de un talo unicelular y el catabolismo del carbono puede ser fermentativo.

En una forma de realización aún más preferida, la célula huésped filamentosa fúngica es una célula de unas especies de, pero no limitada a, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, o *Trichoderma*.

5 En una forma de realización más preferida, la célula huésped filamentosa fúngica es una célula de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*. En otra forma de realización más preferida, la célula huésped filamentosa fúngica es una célula de *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochromum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, o *Fusarium venenatum*. En una forma de realización aún más preferida, la célula madre filamentosa fúngica es una célula de *Fusarium venenatum* (Nirenberg sp. nov.). En otra forma de realización más preferida, la célula huésped filamentosa fúngica es una célula de *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Thielavia terrestris*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, o *Trichoderma viride*.

Las células fúngicas pueden ser transformadas por un proceso que implica la formación del protoplasto, la transformación de los protoplastos, y la regeneración de la pared celular de cierto modo conocido *per se*. Los procedimientos adecuados para la transformación de células huéspedes del *Aspergillus* están descritas en EP 238 023 y Yelton *et al.*, 20 1984, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 81: 1470-1474. Los métodos adecuados para transformar especies de *Fusarium* están descritas por Malardier *et al.*, 1989, *Gene* 78: 147-156 y WO 96/00787. La levadura puede ser transformada usando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, en Abelson, J.N. and Simon, M.I., editors, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology*, Volume 194, pp 182-187, Academic Press, Inc., New York; Ito *et al.*, 1983, *Journal of Bacteriology* 153: 163; y Hinnen *et al.*, 1978, *Proceedings of the* 25 *National Academy of Sciences USA* 75: 1920.

Métodos de producción

La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención que 30 comprende (a) el cultivo de una cepa, que en su forma de tipo salvaje es capaz de producir el polipéptido; y (b) la recuperación del polipéptido. Preferiblemente, la cepa es del género *Pseudoplectanina*, y más preferiblemente *Pseudoplectanina nigrella*.

La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención comprendiendo (a) el cultivo de una célula huésped bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) la 35 recuperación del polipéptido.

En los métodos de producción de la presente invención, las células son cultivadas en un medio nutritivo adecuado para la producción del polipéptido usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula puede ser cultivada 40 por cultivo en un frasco de agitación, fermentación a poca escala o a gran escala (incluyendo fermentaciones continuas, discontinuas, en flujo discontinuo, o en estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales realizados en un medio adecuado y bajo condiciones que permiten que el polipéptido sea expresado y/o aislado. El cultivo se desarrolla en un medio nutritivo adecuado comprendiendo fuentes de nitrógeno y carbono y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Los medios adecuados están disponibles por proveedores comerciales o pueden ser preparados según composiciones publicadas (p. ej., en catálogos de la American Type Culture Collection). Si 45 el polipéptido es segregado en el medio nutritivo, el polipéptido puede ser recuperado directamente del medio. Si el polipéptido no es segregado, éste puede ser recuperado de lisatos celulares.

Los polipéptidos pueden ser detectados usando métodos conocidos en la técnica que son específicos para los 50 polipéptidos. Estos métodos de detección pueden incluir el uso de anticuerpos específicos, la formación de un producto enzimático, o la desaparición de un sustrato enzimático. Por ejemplo, un ensayo enzimático puede ser usado para determinar la actividad del polipéptido como se describe en este caso.

El polipéptido resultante puede ser recuperado por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido 55 puede ser recuperado del medio nutritivo por procedimientos convencionales incluyendo, pero sin limitarse a, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación, o precipitación.

Los polipéptidos de la presente invención pueden ser purificados por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, cromatografía (p. ej., intercambio iónico, afinidad, exclusión hidrofóbica, 60 por cromatografía de tamaño, y por tamaños), procedimientos electroforéticos (p. ej., isoelectroenfoque preparatorio), solubilidad diferencial (p. ej., precipitación del sulfato amónico), SDS-PAGE, o extracción (véase, p. ej., *Protein Purification*, J.-C. Janson and Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989).

Plantas

65 La presente invención también se refiere a una planta transgénica, parte de la planta, o célula de la planta que ha sido transformada con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad antimicrobiana según la presente invención para expresar y producir el polipéptido en cantidades recuperables. El polipéptido puede ser

recuperado de la planta o de parte de la planta. De forma alternativa, la planta o la parte de la planta que contiene el polipéptido recombinante puede ser usada como tal para mejorar la calidad de un alimento o alimentos para animales, p. ej., mejorando su valor nutritivo, apetencia, y propiedades reológicas, o para destruir un factor antinutritivo. El polipéptido recuperado, planta o parte de la planta puede también ser usado para mejorar o alterar la flora digestiva en animales y ganado.

La planta transgénica puede ser dicotiledónea (una dicot) o monocotiledónea (una monocot). Ejemplos de plantas monocotiledóneas son pastos, tales como pasto de prado (pasto pratense, Poa), pasto de forraje tal como Festuca, Lolium, pasto templado, tal como Agrostis, y cereales, p. ej., trigo, avena, centeno, cebada, arroz, sorgo, y maíz.

Ejemplos de plantas dicotiledóneas son tabaco, patata, remolacha azucarera, leguminosas, tales como altramuces, guisante, alubia y semilla de soja, y plantas crucíferas (de la familia *Brassicaceae*), tal como coliflor, semilla de colza, y el organismo modelo *Arabidopsis thaliana* muy relacionado.

Ejemplos de partes de la planta son el tallo, callo, hojas, raíz, frutos, semillas, y tubérculos. Los tejidos de la planta también específicos, tales como cloroplasto, apoplasto, mitocondria, vacuola, peroxisomas, y citoplasma están considerados como una parte de la planta. Además, cualquier célula vegetal, cualquiera que sea el origen del tejido, está considerada como una parte de la planta.

También se incluye dentro del campo de la presente invención la progenie de tales plantas, partes de la planta y células de la planta.

La planta transgénica o la célula vegetal que expresa un polipéptido de la presente invención puede ser construida conforme a métodos conocidos en la técnica. En resumen, la planta o célula vegetal está construida incorporando uno o más constructos que codifica(n) la expresión de un polipéptido de la presente invención en el genoma huésped de la planta y propagando la resultante planta modificada o célula vegetal en una planta transgénica o célula vegetal.

Convenientemente, el constructo de expresión es un constructo de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención operativamente enlazada con las secuencias apropiadas reguladoras requeridas para la expresión de la secuencia de nucleótidos en la planta o parte de la planta de elección. Además, el constructo de expresión puede comprender un marcador seleccionable útil para identificar células huéspedes en las que el constructo de expresión ha sido integrado y las secuencias de ADN necesarias para introducir el constructo en la planta en cuestión (ésto depende del método usado para la introducción del ADN).

La elección de secuencias reguladoras, tales como las secuencias del promotor y del terminador y opcionalmente las secuencias señal o de tránsito está determinada, por ejemplo, basándose en cuándo, dónde, y cómo se desea que el polipéptido sea expresado. Por ejemplo, la expresión del gen que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser constitutiva o inducible, o puede ser desarrollable, específica del estado o tejido, y el producto genético puede estar dirigido a un tejido específico o parte de la planta tal como las semillas u hojas. Las secuencias reguladoras están, por ejemplo, descritas por Tague *et al.*, 1988, *Plant Physiology* 86: 506.

Para la expresión constitutiva, se puede usar el promotor 35S-CaMV (Franck *et al.*, 1980, *Cell* 21: 285-294). Los promotores órgano-específicos pueden ser, por ejemplo, un promotor de tejidos sumidero de almacenamiento tales como semillas, tubérculos de patata, y frutos (Edwards & Coruzzi, 1990, *Ann. Rev. Genet.* 24: 275-303), o de tejidos sumidero metabólicos tales como meristemas (Ito *et al.*, 1994, *Plant Mol. Biol.* 24: 863-878), un promotor específico de las semillas tal como el promotor de la glutelina, prolamina, globulina, o de la albúmina del arroz (Wu *et al.*, 1998, *Plant and Cell Physiology* 39: 885-889), un promotor de la *Vicia faba* de la legúmina B4 y el gen de la proteína de la semilla desconocida de la *Vicia faba* (Conrad *et al.*, 1998, *Journal of Plant Physiology* 152: 708-711), un promotor de una proteína del cuerpo del aceite de semillas (Chen *et al.*, 1998, *Plant and Cell Physiology* 39: 935-941), el promotor *napA* de la proteína de almacenamiento de *Brassica napus*, o cualquier otro promotor específico de semillas conocido en la técnica, p. ej., como se describe en WO 91/14772. Además, el promotor puede ser un promotor específico de las hojas tal como el promotor *rbcS* del arroz o del tomate (Kyojuka *et al.*, 1993, *Plant Physiology* 102: 991-1000), el promotor del gen de la adenina metiltransferasa del virus de la chlorella (Mitra and Higgins, 1994, *Plant Molecular Biology* 26: 85-93), o el promotor *aldP* del gen del arroz (Kagaya *et al.*, 1995, *Molecular and General Genetics* 248: 668-674), o un promotor dañado inducible tal como el promotor *pin2* de la patata (Xu *et al.*, 1993, *Plant Molecular Biology* 22: 573-588).

Un elemento intensificador del promotor puede también ser usado para conseguir una mayor expresión de la enzima en la planta. Por ejemplo, el elemento intensificador del promotor puede ser un intrón que esté colocado entre el promotor y la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención. Por ejemplo, Xu *et al.*, 1993, *supra* describen el uso del primer intrón del gen de la actina 1 del arroz para aumentar la expresión.

El gen del marcador seleccionable y cualquier otra parte del constructo de expresión puede ser elegido entre aquellos disponibles en la técnica.

El constructo de ácidos nucleicos es incorporado en el genoma de la planta según técnicas convencionales conocidas en la técnica, incluyendo la transformación mediada por *Agrobacterium*, la transformación mediada por virus,

la microinyección, el bombardeo de partículas, la transformación biolística, y la electroporación (Gasser *et al.*, 1990, *Science* 244: 1293; Potrykus, 1990, *Bio/Technology* 8: 535; Shimamoto *et al.*, 1989, *Nature* 338: 274).

Actualmente, la transferencia del gen mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es el método de elección para generar dicotiledóneas transgénicas (para una revisión, véase Hooykas and Schilperoort, 1992, *Plant Molecular Biology* 19: 15-38). No obstante esto puede también ser usado para transformar monocotiledóneas, aunque otros métodos de transformación son generalmente preferidos para estas plantas. Actualmente, el método de elección para generar monocotiledóneas transgénicas es el bombardeo de partículas (oro microscópico o partículas del tungsteno revestidas con ADN transformante) de callos embrionarios o embriones en desarrollo (Christou, 1992, *Plant Journal* 2: 275-281; Shimamoto, 1994, *Current Opinion Biotechnology* 5: 158-162; Vasil *et al.*, 1992, *Bio/Technology* 10: 667-674). Un método alternativo para la transformación de monocotiledóneas se basa en la transformación del protoplasto como se describe por Omirulleh *et al.*, 1993, *Plant Molecular Biology* 21: 415-428.

Después de la transformación, los transformantes que tienen incorporado en su interior el constructo de la expresión son seleccionados y regenerados en plantas enteras según métodos bien conocidos en la técnica.

La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención que comprenden (a) el cultivo de una planta transgénica o una célula vegetal que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con actividad antimicrobiana según la presente invención bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) la recuperación del polipéptido.

Composiciones

En otro aspecto ulterior, la presente invención se refiere a composiciones, tales como las composiciones farmacéuticas, que comprenden un polipéptido antimicrobiano de la invención.

La composición puede comprender un polipéptido de la invención como el componente polipeptídico más importante, p. ej., una composición monocomponente. De forma alternativa, la composición puede comprender actividades enzimáticas múltiples, tal como una aminopeptidasa, amilasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celulasa, quitinasa, cutinasa, ciclodextrina glicosiltransferasa, desoxirribonucleasa, esterasa, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, glucoamilasa, alfa-glucosidasa, beta-glucosidasa, haloperoxidasa, invertasa, lacasa, lipasa, manosidasa, oxidasa, enzima pectinolítica, peptidoglutaminasa, peroxidasa, fitasa, polifenoloxidasas, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa, o xilanasa.

Las composiciones pueden además comprender otro agente farmacéuticamente activo, tal como un agente biocida adicional, tal como otro polipéptido antimicrobiano que presenta actividad antimicrobiana tal como se ha definido anteriormente. El agente biocida puede ser un antibiótico, como se conoce en la técnica. Algunas clases de antibióticos incluyen las penicilinas, p. ej. penicilina G, penicilina V, metilicina, oxacilina, carbenicilina, nafcilina, ampicilina, etc.; penicilinas en combinación con inhibidores de la beta-lactamasa, cefalosporinas, p. ej. cefaclor, cefazolina, cefuroxima, moxalactam, etc.; carbapenemos; monobactams; aminoglicósidos; tetraciclinas; macrólidos; lincomicinas; polimixinas; sulfonamidas; quinolonas; cloramfenicol; metronidazol; espectinomycin; trimetoprima; vancomicina; etc. el agente biocida puede también ser un agente antimicótico, incluyendo polienos, p. ej. anfotericina B, nistatina; 5-flucosina; y azoles, p. ej. miconazol, ketoconazol, itraconazol y fluconazol.

En una forma de realización el agente biocida es un agente químico no enzimático. En otra forma de realización el agente biocida es un agente químico no polipéptido.

El agente biocida puede ser capaz de reducir el número de células vivas de *Escherichia coli* (DSM 1576) a 1/100 después de 30 min. incubación a 20°C en una solución acuosa del 25%(p/p); preferiblemente en una solución acuosa del 10%(p/p); más preferiblemente en una solución acuosa del 5%(p/p); incluso más preferiblemente en una solución acuosa del 1%(p/p); más preferiblemente en una solución acuosa del 0.5%(p/p); y en particular en una solución acuosa del 0.1%(p/p) del agente biocida.

El agente biocida puede también ser capaz de inhibir la excrecencia de *Escherichia coli* (DSM 1576) durante 24 horas a 25°C en un sustrato del crecimiento microbiano, añadido en una concentración de 1000 ppm; preferiblemente añadido en una concentración de 500 ppm; más preferiblemente añadido en una concentración de 250 ppm; incluso más preferiblemente cuando se añade en una concentración de 100 ppm; más preferiblemente añadido en una concentración de 50 ppm; y en particular cuando se añade en una concentración de 25 ppm.

El agente biocida puede también ser capaz de reducir el número de células vivas de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) a 1/100 después de 30 min. incubación a 20°C en una solución acuosa del 25%(p/p); preferiblemente en una solución acuosa del 10%(p/p); más preferiblemente en una solución acuosa del 5%(p/p); incluso más preferiblemente en una solución acuosa del 1%(p/p); más preferiblemente en una solución acuosa del 0.5%(p/p); y en particular en una solución acuosa del 0.1%(p/p) del agente biocida.

El agente biocida puede también ser capaz de inhibir la excrecencia de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) durante 24 horas a 25°C en un sustrato del crecimiento microbiano, añadido en una concentración de 1000 ppm; preferiblemente añadido en una concentración de 500 ppm; más preferiblemente añadido en una concentración de 250 ppm;

incluso más preferiblemente cuando se añade en una concentración de 100 ppm; más preferiblemente añadido en una concentración de 50 ppm; y en particular cuando se añade en una concentración de 25 ppm.

El polipéptido antimicrobiano de la invención y el agente biocida de la composición puede ser seleccionado de modo que se obtenga un efecto sinérgico antimicrobiano.

El polipéptido antimicrobiano y el agente biocida de la composición puede ser seleccionado de modo que el número de células vivas de *E. coli* incubada 10 min. a 20°C en una solución acuosa que contiene el 50% p/p (preferiblemente el 25% p/p, más preferiblemente el 10% p/p, más preferiblemente el 5% p/p) del agente biocida y 0.5 ppm (preferiblemente 0.1 ppm) del polipéptido antimicrobiano, sea reducido al menos un 5% (preferiblemente al menos un 10%) más que en comparación con la cantidad que se obtiene por la adición de los resultados de las incubaciones separadas con el agente biocida y el polipéptido antimicrobiano solo, es decir un efecto aditivo simple.

El componente enzimático y el agente biocida de la composición puede también ser seleccionado de modo que la excrecencia de *E. coli* (DSM 1576) a 25°C en un sustrato del crecimiento microbiano que contiene 500 ppm (preferiblemente 250 ppm, más preferiblemente 100 ppm, más preferiblemente 50 ppm) del agente biocida y 0.5 ppm (preferiblemente 0.1 ppm) del polipéptido antimicrobiano, se inhiben al menos un 5% (preferiblemente al menos un 10%) más de tiempo que en comparación con lo que se obtiene añadiendo los resultados de las incubaciones separadas con el agente biocida y el polipéptido antimicrobiano solo, es decir un efecto aditivo simple.

El polipéptido antimicrobiano y el agente biocida de la composición pueden también ser seleccionados de modo que el número de células vivas de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), cuando se incuban 10 min. a 20°C en una solución acuosa que contiene el 50% p/p (preferiblemente el 25% p/p, más preferiblemente el 10% p/p, más preferiblemente el 5% p/p) del agente biocida y 0.5 ppm (preferiblemente 0.1 ppm) del polipéptido antimicrobiano, se reducen al menos un 5% (preferiblemente al menos un 10%) más que si se compara con la cantidad que se obtiene añadiendo los resultados de las incubaciones separadas con el agente biocida y el polipéptido antimicrobiano solo, es decir, un efecto aditivo simple.

El componente enzimático y el agente biocida de la composición pueden también ser seleccionados de modo que la excrecencia de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) a 25°C en un sustrato de crecimiento microbiano que contiene 500 ppm (preferiblemente 250 ppm, más preferiblemente 100 ppm, más preferiblemente 50 ppm) del agente biocida y 0.5 ppm (preferiblemente 0.1 ppm) del polipéptido antimicrobiano, se inhibe al menos un 5% (preferiblemente al menos un 10%) más de tiempo que si se compara con aquel que se obtiene añadiendo los resultados de las incubaciones separadas con el agente biocida y el polipéptido antimicrobiano solo, es decir, un efecto aditivo simple.

Las composiciones pueden comprender un material portador adecuado. Las composiciones pueden también comprender un vehículo de descarga adecuado capaz de descargar los polipéptidos antimicrobianos de la invención en el locus deseado cuando las composiciones son usadas como un medicamento.

Las composiciones pueden ser preparadas según los métodos conocidos en la técnica y pueden estar en forma de una composición líquida o seca. Por ejemplo, la composición del polipéptido puede estar en forma de un granulado o un microgranulado. El polipéptido para ser incluido en la composición puede ser estabilizado según los métodos conocidos en la técnica.

A continuación se proporcionan ejemplos de usos preferidos de las composiciones del polipéptido de la invención. La dosificación de la composición del polipéptido de la invención y otras condiciones bajo las cuales se utiliza la composición pueden ser determinadas basándose en métodos conocidos en la técnica.

Métodos y Usos

La presente invención también incluye varios usos de polipéptidos antimicrobianos. Los polipéptidos antimicrobianos son normalmente útiles en cualquier locus sometido a contaminación por bacterias, hongos, levadura o algas. Normalmente, los loci están en sistemas acuosos tales como sistemas de agua de refrigeración, agua de enjuague de lavandería, sistemas de aceite tales como aceites de corte, lubricantes, campos de aceite y similares, en los que los microorganismos deben ser matados o en los que su crecimiento necesita ser controlado. No obstante, la presente invención puede también ser usada en todas las aplicaciones para las cuales las composiciones antimicrobianas conocidas son útiles, tales como la protección de la madera, látex, adhesivo, pegamento, papel, cartón, tejido, cuero, plástico, calfateo, y alimentos para animales.

Otros usos incluyen la conservación de alimentos, bebidas, cosméticos tales como lociones, cremas, geles, pomadas, jabones, champús, acondicionadores, antitranspirantes, desodorantes, enjuagues bucales, productos para lentes de contacto, formulaciones enzimáticas, o ingredientes alimentarios.

Así, los polipéptidos antimicrobianos de la invención pueden ser útiles como desinfectante, p. ej., en el tratamiento del acné, infecciones oculares o bucales, infecciones cutáneas; en antitranspirantes o desodorantes; en sales de baño para los pies; para limpiar y desinfectar lentes de contacto, superficies duras, dientes (cuidado bucal), lesiones, magulladuras y similares.

En general se contempla que los polipéptidos antimicrobianos de la presente invención son útiles para la limpieza, desinfección o inhibición del crecimiento microbiano en cualquier superficie dura. Ejemplos de superficies, que pueden ventajosamente ser puestas en contacto con los polipéptidos antimicrobianos de la invención son las superficies del equipamiento del proceso usado p. ej. lácteos, plantas de proceso químico o farmacéutico, sistemas de saneamiento del agua, plantas de tratamiento del aceite, plantas de tratamiento de la pasta de papel, plantas de tratamiento del agua, y torres de enfriamiento. Los polipéptidos antimicrobianos de la invención deberían ser usados en una cantidad que sea eficaz para la limpieza, desinfección o inhibición del crecimiento microbiano en la superficie en cuestión.

Además, está contemplado que los polipéptidos antimicrobianos de la invención pueden ventajosamente ser usados en un sistema de limpieza en sitio (C.I.P.) para limpiar el equipamiento del proceso de cualquier tipo.

Los polipéptidos antimicrobianos de la invención pueden adicionalmente ser usados para limpiar superficies y utensilios de cocina en plantas de tratamiento de alimentos y en cualquier área donde los alimentos son preparados o servidos tales como hospitales, clínicas, restaurantes, especialmente restaurantes de comida rápida, delicatessens y similares. Puede también ser usado como un antimicrobiano en productos alimentarios y sería especialmente útil como una superficie antimicrobiana en quesos, frutas y verduras y alimentos en barras saladas.

Puede también ser usado como un agente de conservación o un agente de desinfección en pinturas a base de agua.

Los polipéptidos antimicrobianos de la presente invención son también útiles para el control microbiano de conductos de agua, y para la desinfección del agua, en particular para la desinfección del agua industrial.

La invención también se refiere al uso de un polipéptido antimicrobiano o composición de la invención como un medicamento. Además, un polipéptido antimicrobiano o composición de la invención puede también ser usado para la producción de un medicamento para controlar o combatir microorganismos, tales como organismos fúngicos o bacterias, preferiblemente bacterias gram positivas.

La composición y el polipéptido antimicrobiano de la invención pueden ser usados como un agente antimicrobiano profiláctico o terapéutico veterinario o humano. Así, la composición y el polipéptido antimicrobianos de la invención pueden ser usados en la preparación de agentes profilácticos o terapéuticos veterinarios o humanos para el tratamiento de infecciones microbianas, tales como infecciones bacterianas o fúngicas, preferiblemente infecciones bacterianas gram positivas. En particular las infecciones microbianas pueden estar relacionadas con enfermedades pulmonares incluyendo, pero sin limitarse a, tuberculosis y fibrosis quística; y enfermedades de transmisión sexual incluyendo, pero sin limitarse a, gonorrea y clamidia.

La composición de la invención comprende una cantidad eficaz del polipéptido antimicrobiano de la invención.

El término "cantidad eficaz" cuando se usa en la presente pretende significar una cantidad del polipéptido antimicrobiano que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada como los aminoácidos 1 a 40 de la SEC ID NO:2, o un fragmento o una variante de la misma, que es suficiente para inhibir el crecimiento de los microorganismos en cuestión.

La invención también se refiere a composiciones o productos para la cicatrización de heridas tales como vendajes, dispositivos médicos tales como, p. ej., catéteres y otros productos capilares anti-caspa, tales como champús.

Síntesis *in vitro*

Los péptidos antimicrobianos de la invención pueden ser preparados por síntesis *in vitro*, usando métodos convencionales como los conocidos en la técnica. Varios aparatos comerciales sintéticos están disponibles, por ejemplo sintetizadores automatizados por Applied Biosystems Inc., Beckman, etc. Usando sintetizadores, los aminoácidos de origen natural pueden ser sustituidos por aminoácidos no naturales, particularmente D-isómeros (o D-formas) p. ej. D-alanina y D-isoleucina, diastereoisómeros, cadenas secundarias con longitudes diferentes o funciones, y similares. La secuencia particular y el estilo de preparación será determinado según conveniencia, economía, pureza requerida, y similares.

El enlace químico puede ser proporcionado para varios péptidos o proteínas que comprenden funciones convenientes para la unión, tales como grupos amino para la formación de amidas o de aminas sustituidas, p. ej. aminación reductiva, grupos tiol para la formación de tioéteres o disulfuros, grupos carboxilo para la formación de amidas, y similares.

Si se desea, varios grupos pueden ser introducidos en el péptido durante la síntesis o durante la expresión, lo cual permite el enlace a otras moléculas o a una superficie. Así las cisteínas pueden utilizarse para hacer tioéteres, las histidinas para enlazarse a un ión metálico complejo, los grupos carboxilo para formar amidas o ésteres, los grupos amino para formar amidas, y similares.

Los polipéptidos pueden también ser aislados y purificados según los métodos convencionales de síntesis recombinante. Un lisado puede ser preparado a partir del huésped de expresión y el lisado puede ser purificado por HPLC, cromatografía de exclusión, electroforesis en gel, cromatografía de afinidad, u otra técnica de purificación. En su

mayor parte, las composiciones usadas comprenderán al menos un 20% en peso del producto deseado, con más frecuencia al menos aproximadamente un 75% en peso, preferiblemente al menos aproximadamente un 95% en peso, y para fines terapéuticos, normalmente al menos aproximadamente un 99.5% en peso con respecto a los contaminantes relacionados con el método de preparación del producto y su purificación. Normalmente, los porcentajes se basarán en la proteína total.

Alimentos para animales

La presente invención está también dirigida a métodos para usar polipéptidos con actividad antimicrobiana en alimentos para animales, así como para composiciones y aditivos de alimentos para animales que comprenden los polipéptidos antimicrobianos de la invención.

El término animal incluye todos los animales, incluyendo los seres humanos. Ejemplos de animales son no rumiantes, y rumiantes, tales como vacas, ovejas y caballos. En una forma de realización particular, el animal es un animal no rumiante. Los animales no rumiantes incluyen animales mono-gástricos, p. ej. cerdos o puercos (incluyendo, pero sin limitarse a, lechones, cerdos en crecimiento, y cerdas); aves tal como pavos y pollo (incluyendo pero sin limitarse a pollos para asar, gallinas ponedoras); terneros jóvenes; y peces (incluyendo el salmón pero sin limitarse a éste).

El término alimento o composición alimentaria significa cualquier compuesto, preparación, mezcla, o composición adecuada para, o destinada a la ingesta por un animal.

En el uso según la invención el polipéptido antimicrobiano puede ser alimentado al animal antes, después, o simultáneamente con la dieta. Se prefiere esto último.

En una forma de realización particular, el polipéptido antimicrobiano, en la forma en la que es añadido al alimento, o cuando está siendo incluido en un aditivo para alimentos para animales, está bien definido. Bien definido significa que la preparación del polipéptido antimicrobiano tiene al menos un 50% de pureza según está determinado por cromatografía de exclusión de tamaños (véase ejemplo 12 de WO 01/58275). En otras formas de realización particulares la preparación del polipéptido antimicrobiano tiene al menos un 60, 70, 80, 85, 88, 90, 92, 94, o al menos un 95% de pureza según está determinado por este método.

Es ventajosa una preparación del polipéptido antimicrobiano bien definida. Por ejemplo, es mucho más fácil dosificar correctamente al alimento para animales un polipéptido antimicrobiano que esencialmente no interfiera o contamine otros polipéptidos antimicrobianos. El término dosis se refiere correctamente en particular al objetivo de obtener resultados consistentes y constantes, y la capacidad de optimizar la dosificación en base al efecto deseado.

Para el uso en alimentos para animales, sin embargo, el polipéptido antimicrobiano no necesita ser puro; puede p. ej. incluir otras enzimas, en cuyo caso podría ser calificado de preparación del polipéptido antimicrobiano.

La preparación del polipéptido antimicrobiano puede ser (a) añadida directamente al alimento (o usada directamente en un proceso de tratamiento de proteínas vegetales), o (b) puede ser usada en la producción de una o más composiciones intermedias tales como aditivos o premezclas de alimentos para animales que son posteriormente añadidos al alimento para animales (o usados en un proceso de tratamiento). El grado de pureza anteriormente descrito se refiere a la pureza de la preparación del polipéptido original antimicrobiano, si se usa según (a) o (b) arriba.

Las preparaciones del polipéptido antimicrobiano con purezas de este orden de magnitud son en particular obtenibles usando métodos recombinantes de producción, mientras que éstos no son tan fácilmente obtenidos y también están sometidos a una variación lote a lote mucho más alta cuando el polipéptido antimicrobiano es producido por métodos de fermentación tradicionales.

Tal preparación del polipéptido antimicrobiano puede evidentemente ser mezclada con otras enzimas.

El término proteínas vegetales como se utiliza en este caso se refiere a cualquier compuesto, composición, preparación o mezcla que incluye al menos una proteína derivada de u originada de un vegetal, incluyendo proteínas modificadas y derivados proteínicos. En las formas de realización particulares, el contenido proteínico de las proteínas vegetales es al menos del 10, 20, 30, 40, 50, o 60% (p/p).

Las proteínas vegetales pueden derivar de fuentes proteínicas vegetales, tales como leguminosas y cereales, por ejemplo materiales de plantas de las familias *Fabaceae* (*Leguminosae*), *Cruciferaeae*, *Chenopodiaceae*, y *Poaceae*, tales como harina de soja, harina de altramuza y semilla de colza.

En una forma de realización particular, la fuente de la proteína vegetal es materia de una o más plantas de la familia de las *Fabaceae*, p. ej. semilla de soja, altramuza, guisante, o alubia.

En otra forma de realización particular, la fuente de proteína vegetal es materia de una o más plantas de la familia de las *Chenopodiaceae*, p. ej. remolacha, remolacha azucarera, espinaca o quinoa.

Otros ejemplos de fuentes de proteína vegetal son semillas de colza, y repollo.

La semilla de soja es una fuente de proteína vegetal preferida.

Otros ejemplos de fuentes de proteína vegetal son cereales tales como cebada, trigo, centeno, avena, maíz, arroz, y sorgo.

El polipéptido antimicrobiano puede ser añadido al alimento en cualquier forma, sea como un polipéptido relativamente puro antimicrobiano, o en adición con otros componentes destinados a la adición a alimentos para animales, es decir en forma de aditivos para alimentos para animales, tales como las denominadas premezclas para alimentos para animales.

En otro aspecto la presente invención se refiere a composiciones para el uso en alimentos para animales, tales como alimentos para animales, y aditivos para alimentos para animales, p. ej. premezcla.

Aparte del polipéptido antimicrobiano de la invención, los aditivos para los alimentos para animales según la invención contienen al menos una vitamina soluble en grasa, y/o al menos una vitamina soluble en agua, y/o al menos un mineral traza, y/o al menos un mineral macro.

Otros ingredientes opcionales de aditivos para alimentos para animales son agentes colorantes, compuestos de aromas, estabilizadores, y/o al menos otra enzima seleccionada entre las fitasas EC 3.1.3.8 o 3.1.3.26; las xilanasas EC 3.2.1.8; las galactanasas EC 3.2.1.89; y/o las beta-glucanasas EC 3.2.1.4.

En una forma de realización particular estas otras enzimas están bien definidas (tal y como se ha definido anteriormente para preparaciones del polipéptido antimicrobiano).

Ejemplos de otros péptidos antimicrobianos (AMP's) son CAP18, Leucocina A, tritricina, Protegrina-1, Tanatina, defensina, Ovispirina tal como Novispirina (Robert Lehrer, 2000), y variantes, o fragmentos de los mismos que retienen la actividad antimicrobiana.

Ejemplos de otros polipéptidos antifúngicos (AFP's) son los péptidos *Aspergillus giganteus*, y *Aspergillus Niger*, al igual que variantes y fragmentos de los mismos que retienen la actividad antifúngica, como se describe en WO 94/01459 y PCT/DK02/00289 [reemplazar por número WO una vez publicado].

Normalmente las vitaminas solubles en grasa y en agua, al igual que los minerales traza forman parte de una denominada premezcla destinada a la adición al alimento para animales, mientras que los minerales macro son normalmente añadidos por separado al alimento. Cualquiera de estos tipos de composición, cuando se enriquecen con un polipéptido antimicrobiano de la invención, es un aditivo para alimentos para animales según la invención.

En una forma de realización particular, el aditivo para alimentos para animales según la invención está destinado a ser incluido (o prescrito como teniendo que ser incluido) en dietas o alimentos para animales a niveles del 0.01 al 10.0%; más particularmente del 0.05 al 5.0%; o del 0.2 al 1.0% (% significando g de aditivo por 100 g de alimento). Esto es así en particular para las premezclas.

Las siguientes son listas no exclusivas de ejemplos de estos componentes:

Ejemplos de vitaminas solubles en grasa son vitamina A, vitamina D3, vitamina E, y vitamina K, p. ej. vitamina K3.

Ejemplos de vitaminas solubles en agua son vitamina B12, biotina y colina, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, niacina, ácido fólico y pantotenato, p. ej. Ca-D-pantotenato.

Ejemplos de minerales traza son manganeso, zinc, hierro, cobre, yodo, selenio, y cobalto.

Ejemplos de minerales macro son calcio, fósforo y sodio.

Los requisitos nutritivos de estos componentes (ejemplificados con aves y lechones/cerdos) están catalogados en la tabla A de WO 01/58275. El requisito nutritivo significa que estos componentes deberían ser proporcionados en la dieta en las concentraciones indicadas.

De forma alternativa, el aditivo para alimentos para animales según la invención comprende al menos uno de los componentes individuales especificados en la tabla A de WO 01/58275. Al menos uno de los componentes individuales, uno o más de, uno, o dos, o tres, o cuatro etcétera hasta los trece, o hasta los quince componentes individuales. Más específicamente, al menos este componente individual está incluido en el aditivo según la invención en tal cantidad para proporcionar una concentración en el alimento para animales dentro de la gama indicada en la columna cuatro, o columna cinco, o columna seis de la tabla A.

La presente invención también se refiere a composiciones para alimentos para animales. Las composiciones o dietas para alimentos para animales tienen un contenido relativamente alto de proteínas. Las dietas a base de ave y cerdo pueden estar caracterizadas como se indica en la tabla B de WO 01/58275, columnas 2-3. Las dietas a base de

ES 2 275 011 T3

de pescado pueden estar caracterizadas según se indica en la columna 4 de esta tabla B. Además tales dietas a base de pescado normalmente tienen un contenido en grasa bruto de 200-310 g/kg.

Una composición de alimentos para animales según la invención tiene un contenido proteínico bruto de 50-800 g/kg, y además comprende al menos un polipéptido antimicrobiano según se reivindica en la presente.

Además, o de forma alternativa (al contenido de proteína bruto indicado arriba), la composición del alimento para animales según la invención tiene un contenido de energía metabolizable de 10-30 MJ/kg; y/o un contenido de calcio de 0.1-200 g/kg; y/o un contenido de fósforo disponible de 0.1-200 g/kg; y/o un contenido de metionina de 0.1-100 g/kg; y/o un contenido de metionina más cisteína de 0.1-150 g/kg; y/o un contenido de lisina de 0.5-50 g/kg.

En formas de realización particulares, el contenido de energía metabolizable, proteína en bruto, calcio, fósforo, metionina, metionina más cisteína, y/o lisina está dentro de cualquiera de las gamas 2, 3, 4 o 5 en la tabla B de WO 01/58275 (R. 2-5).

La proteína en bruto se calcula como nitrógeno (N) multiplicado por un factor 6.25, es decir proteína en bruto (g/kg)= N (g/kg) X 6.25. El contenido de nitrógeno está determinado por el método Kjeldahl (A.O.A.C., 1984, Official Methods of Analysis 14th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington DC).

La energía metabolizable puede ser calculada en base a los requisitos de NCR publication Nutrients in swine, ninth revised edition 1988, subcommittee on swine nutrition, committee on animal nutrition, board of agriculture, national research council. National Academy Press, Washington, D.C., pp. 2-6, y European Table of Energy Values for Poultry Feed-stuffs, Spelderholt centre for poultry research and extension, 7361 DA Beekbergen, The Netherlands. Grafisch bedrijf Ponsen & looijen bv, Wageningen. ISBN 90-71463-12-5.

El contenido dietético de calcio, fósforo disponible y aminoácidos en dietas para animales completas se calcula en base a las tablas alimentarias tales como Veevoedertabel 1997, gegevens over chemische samenstelling, verteerbaarheid en voederwaarde van voedermiddelen, Central Veevoederbureau, Runderweg 6, 8219 pk Lelystad. ISBN 90-72839-13-7.

En una forma de realización particular, la composición del alimento para animales de la invención contiene al menos una proteína vegetal o fuente de proteína tal como se ha definido anteriormente.

En otras formas de realización adicionales particulares, la composición del alimento para animales de la invención contiene 0-80% maíz; y/o 0-80% sorgo; y/o 0-70% trigo; y/o 0-70% Cebada; y/o 0-30% avena; y/o 0-40% harina de soja; y/o 0-10% comida para peces; y/o 0-20% lactosuero. Las dietas para animales pueden p. ej. ser fabricadas como alimentos para animales triturados (no comprimidos) o comprimidos. Normalmente, las pastas de alimentos para animales molidas son mezcladas y se agregan cantidades suficientes de vitaminas esenciales y minerales según las especificaciones de las especies en cuestión. Las enzimas pueden ser añadidas como formulaciones enzimáticas sólidas o líquidas. Por ejemplo, una formulación enzimática sólida es normalmente añadida antes o durante la fase de mezcla; y una preparación enzimática líquida es normalmente añadida después de la fase de granulación. La enzima puede también ser incorporada en un aditivo o premezcla para alimentos para animales.

La concentración de la enzima final en la dieta está en la gama de 0.01-200 mg de proteína enzimática por kg de dieta, por ejemplo en la gama de 5-30 mg de proteína enzimática por kg de dieta animal.

El polipéptido antimicrobiano puede ser administrado en una o más de las siguientes cantidades (gamas de dosificación): 0.01-200; o 0.01-100; o 0.05-100; o 0.05-50; o 0.10-10 - todas estas gamas estando en mg proteína del polipéptido antimicrobiano por kg de alimento para animales (ppm).

Para determinar los mg de proteína del polipéptido antimicrobiano por kg de alimento para animales, el polipéptido antimicrobiano es purificado de la composición alimentaria, y la actividad específica del polipéptido purificado antimicrobiano se determina usando un ensayo pertinente (véase en actividad antimicrobiana, sustratos, y ensayos). La actividad antimicrobiana de la composición del alimento para animales y como también se ha determinado usando el mismo ensayo, y en base a estas dos determinaciones, la dosificación se calcula en mg de proteína del polipéptido antimicrobiano por kg de alimento para animales.

Los mismos principios se aplican para determinar los mg de proteína del polipéptido antimicrobiano en los aditivos del alimento para animales. Evidentemente, si está disponible una muestra del polipéptido antimicrobiano usado para preparar el aditivo del alimento para animales o el alimento, se determinará la actividad específica de esta muestra (sin necesidad de purificar el polipéptido antimicrobiano de la composición del alimento para animales o del aditivo).

Composición de detergente

Los polipéptidos antimicrobianos de la invención pueden ser añadidos, convirtiéndose así en un componente de una composición de detergente.

La composición de detergente de la invención puede por ejemplo ser formulada como una composición de de-

tergente de lavado a mano o a máquina incluyendo una composición del aditivo para lavandería adecuado para el pretratamiento de tejidos teñidos y una composición suavizante añadida al enjuague, o ser formulada como una composición de detergente para el uso en general en operaciones de limpieza de superficies duras del hogar, o ser formulada para operaciones de lavavajillas a mano o a máquina.

En un aspecto específico, la invención proporciona un aditivo detergente que comprende los polipéptidos antimicrobianos de la invención y un agente tensioactivo. El aditivo detergente al igual que la composición de detergente puede comprender una o más enzimas tales como una proteasa, una lipasa, una cutinasa, una amilasa, una carbohidrasa, una celulasa, una pectinasa, una mananasa, una arabinasa, una galactanasa, una xilanasas, una oxidasa (tal como una lacasa), y/o una peroxidasa (tal como una haloperoxidasa).

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

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

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

Lipasas: las lipasas adecuadas incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico. Los mutantes modificados químicamente o creados genéticamente por proteínas están incluidos. Ejemplos de lipasas útiles incluyen lipasas de *Humicola* (sinónimo de *Thermomyces*), p. ej. de *H. lanuginosa* (*T. lanuginosus*) como se describe en EP 258 068 y EP 305 216 o de *H. insolens* como se describe en WO 96/13580, una lipasa de *Pseudomonas*, p. ej. de *P. alcaligenes* o *P. pseudoalcaligenes* (EP 218 272), *P. cepacia* (EP 331 376), *P. stutzeri* (GB 1,372,034), *P. fluorescens*, cepa SD 705 de *Pseudomonas* sp. (WO 95/06720 y WO 96/27002), *P. wisconsinensis* (WO 96/12012), una lipasa de *Bacillus*, p. ej. de *B. subtilis* (Dartois et al. (1993), Biochemica et Biophysica Acta, 1131, 253-360), *B. stearrowthermophilus* (JP 64/744992) o *B. pumilus* (WO 91/16422).

Otros ejemplos son variantes de la lipasa tales como los descritos en WO 92/05249, WO 94/01541, EP 407 225, EP 260 105, WO 95/35381, WO 96/00292, WO 95/30744, WO 94/25578, WO 95/14783, WO 95/22615, WO 97/04079 y WO 97/07202.

Amilasas: Las (alfa y/o beta) amilasas adecuadas incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico. Los mutantes modificados químicamente o creados genéticamente por proteínas están incluidos. Las amilasas incluyen, por ejemplo, las alfa-amilasas obtenidas a partir de *Bacillus*, p. ej. una cepa especial de *B. licheniformis*, descrita con más detalle en GB 1,296,839.

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

Celulasas: Las celulasas adecuadas incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico. Los mutantes modificados químicamente o creados genéticamente están incluidos. Las celulasas adecuadas incluyen celulasas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, p. ej. Las celulasas fúngicas producidas a partir de *Humicola insolens*, *Myceliophthora thermophila* y *Fusarium oxysporum* descrito en US 4,435,307, US 5,648,263, US 5,691,178, US 5,776,757 y WO 89/09259.

Las celulasas especialmente adecuadas son las celulasas alcalinas o neutrales con beneficios para el cuidado del color. Ejemplos de tales celulasas son las celulasas descritas en EP 0 495 257, EP 0 531 372, WO 96/11262, WO 96/29397, WO 98/08940. Otros ejemplos son variantes de la celulasa tales como los descritos en WO 94/07998, EP 0 531 315, US 5,457,046, US 5,686,593, US 5,763,254, WO 95/24471, WO 98/12307 y PCT/DK98/00299.

Peroxidasas/oxidases: peroxidasas/oxidases adecuadas incluyen las de origen vegetal, bacteriano o fúngico. Los mutantes creados genéticamente de proteínas o químicamente modificados están incluidos. Ejemplos de peroxidasas útiles incluyen las peroxidasas de *Coprinus*, p. ej. de *C. cinereus*, y variantes de las mismas como las descritas en WO 93/24618, WO 95/10602, y WO 98/15257.

La(s) enzima(s) de detergente(s) puede(n) ser incluida(s) en una composición de detergente añadiendo aditivos separados que contienen una o más enzimas, o añadiendo un aditivo combinado que comprende todas estas enzimas. Un aditivo detergente de la invención, es decir un aditivo separado o un aditivo combinado, puede ser formulado p. ej.

como un granulado, un líquido, una pasta, etc. Las formulaciones del aditivo detergente preferidas son granulados, en particular granulados no pulverulentos, líquidos, en particular líquidos estabilizados, o mezclas.

Los granulados no pulverulentos pueden ser producidos, p. ej., como está descrito en US 4,106,991 y US 4,661,452 y pueden opcionalmente ser revestidos por métodos conocidos en la técnica. Ejemplos de materiales de revestimiento cerosos son productos de óxido de poli(etileno) (polietilenoglicol, PEG) con pesos molares medios de 1000 a 20000; nonilfenoles etoxilados con de 16 a 50 unidades de óxido de etileno; alcoholes etoxilados grasos donde el alcohol contiene de 12 a 20 átomos de carbono y donde hay de 15 a 80 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos; ácidos grasos; y mono- y di- y triglicéridos de ácidos grasos. Ejemplos de materiales de revestimiento que forman películas adecuadas para la aplicación por técnicas de lecho fluidificado están proporcionados en GB 1483591. Las preparaciones enzimáticas líquidas pueden, por ejemplo, ser estabilizadas añadiendo un poliol tal como propilenoglicol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico o ácido bórico según los métodos establecidos. Las enzimas protegidas pueden ser preparadas según el método descrito en EP 238,216.

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

La composición de detergente comprende uno o más agentes tensioactivos, que pueden ser no iónicos incluyendo semipolares y/o aniónicos y/o catiónicos y/o zwitteriónicos. Los agentes tensioactivos están normalmente presentes a un nivel del 0.1% al 60% en peso.

Cuando se incluye en ésta, el detergente normalmente contiene de aproximadamente del 1% a aproximadamente el 40% de un agente tensioactivo aniónico tal como alquilobencenosulfonato lineal, alfa-olefinsulfonato, alquil sulfato (sulfato de alcohol graso), etoxisulfato de alcohol, alcanosulfonato secundario, alfa-sulfo metil éster de ácido graso, ácido alquil- o alquenilsuccínico o jabón.

Cuando se incluye en ésta, el detergente normalmente contiene de aproximadamente el 0.2% a aproximadamente el 40% de un agente tensioactivo no iónico tal como etoxilato de alcohol, etoxilato de nonilfenol, alquilpoliglicósido, óxido de alquildimetilamina, monoetanolamida de ácido graso etoxilado, monoetanolamida de ácido graso, amida de ácido polihidroxil alquil graso, o derivados de N-acil N-alquil glucosamina ("glucamidas").

El detergente puede contener un 0-65% de un constructor de detergente o agente complejante tal como zeolita, difosfato, trifosfato, fosfonato, carbonato, citrato, ácido nitrilotriacético, ácido etilendiaminatetraacético, ácido dietilendiaminopentaacético, ácido alquil- o alquenilsuccínico, silicatos solubles o silicatos estratificados (p. ej. SKS-6 de Hoechst).

El detergente puede comprender uno o más polímeros. Ejemplos son carboximetilcelulosa, poli(vinilpirrolidona), poli(etilenoglicol), alcohol de poli(vinilo), poli(vinilpiridina-N-óxido), poli(vinilimidazol), policarboxilatos tales como poli(acrilatos), copolímeros de ácido maléico/acrílico y copolímeros de lauril metacrilato/ácido acrílico.

El detergente puede contener un sistema blanqueante que puede comprender una fuente de H₂O₂ tal como perborato o percarbonato que puede ser combinada con un activador de la decoloración formador de perácido tal como tetraacetilendiamina o nonanoiloxibencenosulfonato. De forma alternativa, el sistema blanqueador puede comprender peroxiacidos de p. ej. tipo amida, imida, o sulfona.

La(s) enzima(s) de la composición detergente de la invención puede(n) ser estabilizada(s) 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, p. ej., un éster de borato aromático, o un derivado del ácido fenil borónico tal como ácido 4-formilfenil borónico, y la composición puede ser formulada como se describe p. ej. en WO 92/19709 y WO 92/19708.

El detergente puede también contener otros ingredientes de detergentes convencionales tales como p. ej. acondicionadores del tejido que incluyen arcillas, reforzadores de la espuma, supresores de la espuma, agentes anticorrosivos, agentes de suspensión de la suciedad, agentes de reposición antisuciedad, tintes, bactericidas, blanqueadores ópticos, hidrótopos, inhibidores de la decoloración, o perfumes.

Está actualmente contemplado que en las composiciones detergentes se puede añadir cualquier enzima, y los polipéptidos antimicrobianos de la invención, en una cantidad correspondiente a 0.01-100 mg de proteína enzimática por litro de agua de lavado, preferiblemente 0.05-10 mg de proteína enzimática por litro de agua de lavado, más preferiblemente 0.1-5 mg de proteína enzimática por litro de agua de lavado, y más preferiblemente 0.1-1 mg de proteína enzimática por litro de agua de lavado.

Los polipéptidos antimicrobianos de la invención pueden adicionalmente ser incorporados en las formulaciones detergentes descritas en WO 97/07202.

La presente invención está posteriormente descrita por los ejemplos siguientes que no deberían ser interpretados como limitadores del objetivo de la invención.

Ejemplos

Los productos químicos usados como tampones y sustratos fueron productos comerciales al menos de calidad de reactivo.

Ejemplo 1

Identificación de un polipéptido antimicrobiano de *Pseudoplectania nigrella*

Materiales y métodos

Una biblioteca de ADNc fue obtenida a partir de medios de *P. nigrella* inducidos durante 5 días en medios Mex-1 (protocolo encontrado en los ejemplos de la solicitud de patente internacional WO 98/38288). El ARN enriquecido con PolyA fue purificado, el ADNc fue sintetizado y la biblioteca fue realizada según procedimientos de biología molecular estándares. Un protocolo detallado sobre el proceso general puede encontrarse en los ejemplos de la solicitud de patente internacional WO 01/12794. El vector usado para la clonación fue *pMhas5*, que está mostrado en la SEC ID NO:4 y tiene las características siguientes:

TABLA 1

Características del vector pMhas5

Característica	Ubicación	Descripción
CDS	365-1156	Resistencia a la canamicina
CDS	2232-2387	alfa péptido de beta galactosidasa
señal -10	2189-2192	Shine Dalgarno
promotor	2101-2189	Promotor Lac
característica misc	626-650	cebador KanP1 para sistema BACE

Características notables de este plásmido son los sitios de restricción EcoRI-NotI próximos a la región Shine Dalgarno del promotor Lac. Esto permite que los ADNc adaptados a EcoRI-NotI sean clonados en el vector y los resultantes constructos sean activamente transcritos y traducidos en el huésped de *E. coli*.

Construcción de la biblioteca de *Pseudoplectania nigrella* y captura de señales del conjunto de plásmidos resultantes del ADNc

Un conjunto de plásmidos de ADNc fue obtenido a partir de 20,000 transformantes totales de la ligación del vector *pMhas5* original del ADNc. El ADN plásmido fue preparado directamente a partir de un conjunto de colonias recuperadas de medios selectivos de LB sólidos según el protocolo Qiagen para el aislamiento del ADN plásmido (Qiagen Inc.). El conjunto de plásmidos fue tratado con el transposón SigA2 y la transposasa MuA según las instrucciones del fabricante de la transposasa (Finnzyme, Finlandia). Se puede encontrar información general sobre la captura de señales asistida por transposones en la solicitud de patente internacional WO 01/77315. La mezcla resultante fue precipitada con etanol para eliminar el exceso de sal y 1.5 microlitros sometidos a electroporación en 20 microlitros de células ultracompetentes DH10B según el protocolo estándar provisto de las células (Gibco-BRL). Las células sometidas a electroporación fueron incubadas en medios SOC con agitación (28 grados celsius, 2 horas, 250 rpm) antes de ser colocadas en placas en medios selectivos. Tres medios de agar fueron usados:

LB + 50 microgramos pr. ml de canamicina,

LB + canamicina + 15 microgramos pr. ml de cloramfencol, o

LB + canamicina + cloranfenicol + 12.5 microgramos pr. ml de ampicilina.

A partir de la dilución en placas de electroporación en el medio LB+canamicina+cloramfencol, se determinó que había aproximadamente 119,000 colonias que contenían un plásmido del banco de ADNc con una transposición de SigA2. Las 363 colonias fueron recuperadas del experimento bajo triple selección. Las 363 colonias fueron réplicas colocadas en placas bajo triple selección con 50 microgramos pr. ml de ampicilina para seleccionar los capturadores de señales reales. Un total de 336 colonias fueron capaces de crecer bajo la concentración de ampicilina aumentada y éstas fueron minipreparadas según el protocolo Qiagen Qiaturno96 (Qiagen Inc.). Los plásmidos fueron ordenados con el cebadores sentido y antisentido (cebadores A y B) del transposón según el procedimiento descrito en los ejemplos de la solicitud de patente internacional WO 01/77315.

ES 2 275 011 T3

Cebador A agcgt ttgcg gccgc gatcc (SEC ID NO:16)

Cebador B: ttatt cggtc gaaaa ggatc c (SEC ID NO: 17)

Se obtuvo la secuencia de ADN para las reacciones en un secuenciador capilar AB3700. Las secuencias fueron recortadas para eliminar la secuencia del vector y del transposón y el cebador A y B leyeron para cada plásmido ensamblado. Esto resultó en 225 secuencias ensambladas que fueron agrupadas por homología secuencial en 145 secuencias contiguas. Las 145 secuencias contiguas fueron independientemente alineadas por BLAST y los resultados fueron analizados. Un plásmido (Plectasina_6_B12) compartía cierta homología del aminoácido con polipéptidos antimicrobianos conocidos (polipéptidos tipo defensina).

En los ejemplos siguientes se hace referencia al polipéptido antimicrobiano de la invención como "Plectasina".

Ejemplo 2

Construcción de un vector de expresión de *Aspergillus* para Plectasina

La secuencia de codificación de la plectasina fue amplificada del banco de ADNc anterior (véase ejemplo 1 anterior) de la manera siguiente: 1 microlitro de ADNc (aproximadamente 10 nanogramos de ADN) fue usado como molde en una reacción PCR con los dos cebadores 178 y 179.

Cebador 178: tctgg atcca ccatg caatt tacca ccatc ctctc (SEC ID NO:7)

Cebador 179: tctct cgagc tagta acact tgcaa acaaa gc (SEC ID NO:8)

10 pmol de cada cebador fue usado en un volumen de reacción de 100 microlitros. La temperatura de recocimiento fue 55 grados celsius, y se extendió a 72 grados celsius durante 1 minuto. Un total de 35 ciclos fueron realizados. Se usó el Expand High Fidelity PCR System (Roche).

Partes alícuotas de la reacción de PCR fueron separadas en un 4% de gel de agarosa. Se visualizaron dos bandas diferentes: La banda más prominente a un tamaño de aproximadamente 300 bp y una banda algo más débil a aproximadamente 350 bp.

Ambos fragmentos fueron digeridos con BamHI y XhoI que cortan las proyecciones introducidas por los cebadores de la PCR. Los fragmentos digeridos fueron aislados y clonados en pMT2188, un plásmido de expresión de *Aspergillus* basado en el plásmido pCaHj527 (ver los ejemplos de la solicitud de patente internacional WO 00/70064) construido según se describe en el ejemplo 7 de la solicitud de patente Danesa PA 2001 00088. Se encontró que el fragmento más corto contenía la secuencia de codificación de la plectasina según se ha determinado a partir del experimento de captura de señales (ver ejemplo 1 anterior). La secuencia de este fragmento de PCR más corto está mostrada como SEC ID NO:5.

De forma similar, se determinó que la secuencia del fragmento de PCR más largo contenía la secuencia de codificación de la Plectasina y un inserto adicional de 58 bp. Se observó que el inserto de 58 bp contenía las características consensuales de un intrón fúngico, y la amplificación de este producto se toma como evidencia de la eliminación del intrón incompleta en el conjunto del ARNm y el banco de ADNc derivado. La secuencia de este fragmento de PCR más largo está mostrada como la SEC ID NO:6. El plásmido de expresión de *Aspergillus* para el producto de la PCR más corto (SEC ID NO:5) fue denominado pMT2548.

Ejemplo 3

Expresión de la Plectasina en *Aspergillus*

PMT2548 fue transformado en la cepa BECh2 de *Aspergillus oryzae* (descrita en la solicitud de patente internacional WO 00/39322) y en MBin118 de *Aspergillus Niger*. 30 transformantes de cada cepa fueron reaislados dos veces bajo condiciones selectivas y no inductoras en placas mínimas de Cove con sacarosa y acetamida. Para evaluar la expresión de la Plectasina, los transformantes fueron hechos crecer durante 6 días a 30 grados celsius en tubos con 10 ml de YPM (2% peptona, 1% extracto de levadura, 2% maltosa). Los sobrenadantes fueron realizados en el 10% de geles Bis-tris SDS NuPage (Invitrogen) según lo recomendado por el fabricante con el tampón MES en funcionamiento para permitir la separación en una gama de Pm baja. Ambas cepas de *Aspergillus* crecieron bien e incluso indujeron la expresión de la Plectasina. Una banda diferente del tamaño previsto para la Plectasina fue vista en más transformantes mientras que esta banda no fue vista en las cepas BECh2 huéspedes no transformadas de *A. oryzae* y MBin118 de *A. Niger*. Resultó que la banda de Plectasina fue más grande en los transformantes de BECh2 que en los transformantes de MBin118. Se estimó, muy aproximadamente y basándose en la intensidad de la coloración sólo, que el rendimiento bajo estas condiciones de crecimiento era del orden de 10-50 mg por litro de medio de cultivo.

Ejemplo 4

Clonación de la Plectasina en el Sistema de Expresión de Suicidas (SES)

[0260] El fragmento de Plectasina fue amplificado por PCR usando el ADNc de la Plectasina de longitud total como molde (Plectasina_6_ B12) y los cebadores DR34F y DR34R de los enlazadores NcoI y XbaI.

DR34F: ccggccatgg gatttggatg caatggtcct tggg (SEC ID NO:9)

DR34R: : gccgtctaga gccatctagt aacacttgca aacaaagccc cccttagc (SEC ID NO:10)

La amplificación de la PCR se efectuó usando una PWO ADN polimerasa según el fabricante (Roche Bioscience, CA). El producto de la PCR fue digerido con NcoI y XbaI e insertado de forma direccional en los plásmidos PHHA y PHH (descritos en los ejemplos de la solicitud de patente internacional WO 00/73433). Los plásmidos resultantes fueron denominados pDR-18-plectasina para la expresión citoplásmica del péptido y pDRS-18-plectasina para la expresión periplásmica.

Ambos plásmidos contenían la secuencia de aminoácidos siguiente del fragmento de Plectasina:

mGFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGGYCAKGGFVCKCY (SEC ID NO:11)

donde m (metionina) no está presente en la Plectasina nativa pero fue introducida como resultado de la estrategia de clonación.

Inhibición del crecimiento de E. coli tras la expresión de la Plectasina

Para evaluar si se inhibió el crecimiento de *E. coli* en el medio líquido tras la inducción de la expresión de la Plectasina endógena, el siguiente experimento fue realizado según se describe en los ejemplos de la solicitud de patente internacional WO 00/73433. En resumen, los cultivos frescos durante toda la noche de las células que contenían sea pDRS-18-plectasina, pDR-18-plectasina, plásmido pHH o pHHA fueron diluidos 300-veces en 150 micro litros de LB o LB con el 0.1% arabinosa en una placa de microtitulación y se incubó a 37 grados celsius con agitación vigorosa. La curva de crecimiento fue controlada midiendo OD₄₅₀ a intervalos regulares usando un lector ELISA. Los resultados mostraron que la Plectasina inhibió el 41% del crecimiento celular al dirigirse al periplasma, sin embargo, no afectó al crecimiento celular expresado en el citoplasma (ver tabla a continuación).

TABLA 2

Inhibición del crecimiento celular

Constructo	% Inhibición
pHH	16%
pHH-plectasina (pDRS-18-plectasina)	41%
pHHA	12%
pHHA-plectasina (pDR-18-plectasina)	13%

Ejemplo 5

*Clonación, expresión y evaluación de la actividad de la Plectasina de P. nigrella en E. coli**Clonación de la Plectasina de P. nigrella en pET31b+*

Para producir Plectasina para ensayos de actividad antimicrobiana, el ADNc que codificaba la Plectasina fue insertado en el vector de expresión pET31 b+ (Novagen Inc., WI). Mediante los oligonucleótidos específicamente diseñados (Cebador1 y Cebador2) el gen de la plectasina fue amplificado por reacción en cadena por la polimerasa usando la PWO ADN-polimerasa según el fabricante (Roche Bioscience, CA).

Cebador1: attattcagatgctggatcc gaaaaacctgcgtcgcatc tccgcaaaggcatccatc (SEC ID NO:12)

Cebador2: aataatctcgagtatttagc catatttttatgatgatgg atgcctttgcggataatgcg ac (SEC ID NO:13)

La digestión enzimática de los sitios de restricción flanqueante de la endonucleasa (AiwNI/Aval) nos permitió clonar este gen como un constructo de la fusión en pET31 b+ (procedimientos estándar según está descrito por el

ES 2 275 011 T3

fabricante (New England Biolabs Inc., MA). Todos los protocolos estándar han sido descritos en otro lugar (Sambrook, Fritsch, y Maniatis, 1989).

Transformación y expresión de la Plectasina de P. nigrella en E. coli

pET31 b+ recombinante fue transformado en *E. coli* Novablue está descrito por el fabricante (Novagen). El plásmido fue preparado por QIAprep Mini Columns (QIAGEN Inc., CA) y ordenado por secuenciación automatizada usando los cebadores específicos de los plásmidos (Cebador3 y Cebador4).

Cebador3: tgctagttat tgctcagcgg (SEC ID NO:14)
Cebador4: accgtagttg cgcccatcg (SEC ID NO:15)

El plásmido fue transformado en BLR-DE3 de *E. coli* según el fabricante (Novagen). Las bacterias fueron cultivadas en un medio de LB hasta OD₆₀₀ ~0.8 y la síntesis de la proteína recombinante fue iniciada por 1 mM de IPTG (isopropil beta-D-Tiogalactopiranosida). Después de 3 horas de inducción, las bacterias fueron cosechadas, resuspendidas en un tampón A con un volumen 1/10 (50 mM tris-HCl, 1 mM de EDTA, 100 mM de NaCl, pH 8) y lisadas por ruptura de la presión (1500 mbar). El granulado resultante fue lavado dos veces en un tampón B (50 mM tris-HCl, 10 mM de EDTA, 0.5% TritonX-100, 100 mM de NaCl, pH 8). Todos los protocolos estándar han sido descritos en otro lugar (Sambrook, Fritsch, y Maniatis, 1989).

Purificación de la Plectasina de P. nigrella de cuerpos de inclusión de E. coli

El granulado resultante de la purificación anterior contenía cuerpos de inclusión purificados. Para liberar el péptido de la pareja de fusión KSI, la hidrólisis del ácido fue realizada en un sitio Asp-Pro creado genéticamente, introducido N-terminalmente en el gen de codificación de la Plectasina.

Los cuerpos de inclusión fueron resuspendidos en 100 mM de fosfato sódico (pH 2.3) e incubados durante toda la noche a 85 grados celsius. El sobrenadante resultante contenía Prolina-Plectasina y la muestra fue neutralizada por 100 mM de fosfato sódico (pH 12.3). La identidad de Prolina-Plectasina fue confirmada por espectrometría de masas. Todos los protocolos estándares han sido descritos en otro lugar (Sambrook, Fritsch, y Maniatis, 1989).

Actividad antimicrobiana por ensayo de la difusión radial

Una versión modificada de un protocolo previamente publicado ha sido aplicada en la detección de la actividad antimicrobiana (Lehrer *et Al.*, (1991) Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides *J Immunol Methods* 137: 167-173). Las bacterias de destino (10⁶ unidades de formación de colonias (CFU)) fueron añadidas a 10 ml de la capa inferior de agarosa (1% de agarosa de baja elctroendósmosis, 0.03% de caldo de tripticasa de soja, 10 mM de fosfato sódico, pH 7.4, 37 grados celsius). La suspensión fue solidificada en una placa Petri INTEGRID (Becton Dickinson Labware, NJ). 3 mm de Gel Puncher fueron usados para hacer agujeros en la capa inferior de agarosa (Amersham Pharmacia Biotech, Suecia). Las muestras fueron añadidas a los orificios e incubadas a 37 grados celsius, 3 horas. Una sobrecapa fue vertida en la superficie y la placa fue incubada durante toda la noche (medio de LB, 7.5% Agar). La actividad antimicrobiana fue vista como zonas de claridad bacteriana alrededor de los pocillos. Las células vivas fueron contrateñidas añadiendo 10 ml, 0.2 mM de MTT azul de tiazolil de (3-(4-Dimetiltiazol-2-il) 2-difeniltetrazolium bromuro). Todos los protocolos estándares han sido descritos en otro lugar (Sambrook, Fritsch, y Maniatis, 1989).

Actividad antimicrobiana de la Plectasina contra Bacillus subtilis

Para evaluar la actividad anti-microbiana de la Plectasina, los caldos de fermentación de *Aspergillus oryzae* recombinante fueron aplicados en diluciones de series de 2 veces en un ensayo de difusión radial (anteriormente descrito). Las grandes zonas de compensación fueron vistas al examinar la muestra contra *Bacillus subtilis* según el protocolo anterior. La zona de claridad más grande se obtuvo con caldo de fermentación no diluido (15 mm), mientras que las muestras tomadas de *Aspergillus oryzae* no recombinante no mostró actividad antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*.

Plectasina expresada a través de cuerpos de inclusión en un huésped alternativo de E. coli

Para aumentar la cantidad de Plectasina recuperada con actividad antimicrobiana, la Plectasina fue expresada en Origami-DE3 (Novagen Inc.) de *E. coli*. Esta cepa lleva una mutación en los genes que codifican la tiorredoxina reductasa (*trxB*) y glutatona-reductasa (*gor*). El plásmido pET31 b+ recombinante que codifica la Plectasina fue transformado en Origami- DE3 de *E.coli* según el fabricante (Novagen). El cultivo, expresión y aislamiento de la Plectasina que contiene cuerpos de inclusión fue realizado según el modo descrito anteriormente (Transformación y expresión de Plectasina de *P. nigrella* en *E. coli*). La recuperación de la Plectasina fue según el modo descrito anteriormente (Purificación de Plectasina de *P. nigrella* de cuerpos de inclusión de *E. coli*). Posteriormente, el ensayo de difusión radial fue usado para acceder a la actividad antimicrobiana (ver arriba: Actividad antimicrobiana por ensayo de difusión radial).

Los resultados muestran que la producción de péptidos de plectasina en Origami-DE3 de *E. coli* resulta en un aumento de 5-10 veces en la actividad antimicrobiana del péptido. La actividad biológica aumentada de la Plectasina fue adicionalmente soportada por el hecho de que resultados similares fueron obtenidos los cuales expresaban otra defensina, la beta-defensina 3 humana. Concluimos que las cepas de *E. coli* que permiten la formación de enlaces disulfuro en el citoplasma son generalmente aplicables en la biosíntesis de defensinas biológicamente activas y otros péptidos antimicrobianos con puentes disulfuro.

Ejemplo 6

10 Construcción del vector de expresión de *Saccharomyces cerevisiae* para Plectasina

Para evaluar la expresión de la Plectasina en *S. cerevisiae*, se hicieron dos constructos plásmidos diferentes, pHH3875 y pHH3876. pHH3875 codifica el alfa-líder de *S. cerevisiae* fusionado a la Plectasina madura. La Plectasina puede ser liberada del alfa-líder y por lo tanto madurada a través de una secuencia de seccionamiento KEX2. 15 pHH3876 codifica el alfa-líder fusionado a la pro-región de la Plectasina seguida de la Plectasina madura. En este constructo, un sitio KEX2 está presente entre el alfa-líder y la pro-región de Plectasina, mientras que otro sitio KEX2 separa la pro-región de la Plectasina con la Plectasina misma.

20 Construcción de pHH3875 – alfa-líder/KEX2/Plectasina

El gen de la plectasina fue amplificado en una reacción PCR estándar usando los cebadores pHH3875-Forw y pHH3875-Rev descritos a continuación. El plásmido pMT2548 de *Aspergillus* del Ejemplo 2 fue usado como molde de ADN en la reacción PCR. El fragmento resultante de ADN fue purificado usando un kit de purificación de PCR Qiaquick (Qiagen) y restringido con XbaI y ClaI que cortan las proyecciones introducidas por los cebadores. El 25 fragmento fue adicionalmente purificado a partir del 2% de gel de agarosa y ligado en un vector de expresión de *S. cerevisiae* también restringido con XbaI y ClaI. Este vector transportador de 2p basado en *E. coli*/levadura emplea el promotor tpi constitutivo para conducir la expresión de la fusión alfa-líder/pectasina, utiliza beta-lactamasa para selección fenotípica en *E. coli*, y lleva el gen POT para la selección del plásmido en la tpi levadura (MT663; α/α , $\Delta tpi/\Delta tpi$, pep4-3/pep4-3).

30 Cebador pHH3875-Forw

gaagg ggtat cgatg gctaa gagag gattt ggatg caatg gtcct tggga tgagg (SEC ID NO:18)

35 Cebador pHH3875-Rev:

cttag ttctt agact agtaa cactt gcaaa caaag ccccc c (SEC ID NO:19)

40 Construcción de pHH3876 – alfa-líder/KEX2/pro-región/KEX2/Plectasina

El protocolo para la construcción de pHH3876 es idéntico al de pHH3875 a excepción de los cebadores del ADN empleado. Para pHH3876, se usaron los cebadores descritos abajo:

45 Cebador pHH3876-Forw:

gaagg ggtat cgatg gctaa gagag cacc cagcc tggc cggag gctta cgc (SEC ID NO:20)

Cebador pHH3876-Rev (idéntico para pHH3875-Rev):

50 cttag ttctt agact agtaa cactt gcaaa caaag ccccc c (SEC ID NO:21)

Expresión de la Plectasina en *S. cerevisiae*

Los plásmidos pHH3902 (control), pHH3875 y pHH3876 fueron transformados en la cepa MT633 de *S. cerevisiae* usando un protocolo de acetato de litio. Diferentes transformantes de pHH3902, pHH3875 y pHH3876, fueron seleccionados, dispuestos en líneas en placas de SC molido/agar (conteniendo agar molido con SC, 2% D-glucosa, 0.02% 55 treonina) e incubados a 30 grados Celsius hasta que las colonias se desarrollaron.

Para evaluar la expresión, se inocularon colonias individuales en 10 ml de SC molido líquido (conteniendo SC molido, 2% D-glucosa, 0.02% de treonina), se incubó bajo agitación vigorosa a 30 grados Celsius durante 3 días. Los sobrenadantes fueron realizados en un 16% de geles de Tricina (Novex) para dar la separación óptima en el área de bajo peso molecular. En paralelo, los sobrenadantes fueron concentrados desde 500 microlitros hasta 20 microlitros usando una columna de rotación microcon con un corte de PM de 3kDa. Todas las muestras de pHH3875 y pHH3876 mostraron bandas del péptido del tamaño previsto. Las muestras concentradas mostraron las bandas más prominentes. 65

Para obtener información más detallada, los sobrenadantes fueron analizados usando un espectrómetro de masas de tipo MALDI (Voyager DE-Pro de Perseptive Biosystems).

ES 2 275 011 T3

Para pHH3875, un pico mayor fue observado a masas de 4410-4411. Esto está muy próximo a la masa prevista de 4402 para la Plectasina correctamente producida y procesada.

Para pHH3876, diferentes picos fueron observados. Los dos picos más prominentes fueron encontrados a masas de 4411-4413 y 7870-7871. El pico 4411 nuevamente concuerda con la Plectasina correctamente procesada. El pico a 7870 corresponde más bien a la Plectasina semi-procesada donde la Pro-región no está seccionada de la Plectasina. Se encontraron diferentes productos de descomposición supuestamente con el pico 7870.

Actividad de la Plectasina a partir de pHH3875 y pHH3876

Los sobrenadantes anteriormente descritos fueron analizados en un ensayo de difusión radial como se describe en el ejemplo 5.

TABLA 3

Zona de inhibición aproximada (mm)

Plásmido	Normal	Concentrado
pHH3902	0	0
pHH3875	5	12
pHH3876	8	14

Sorprendentemente, pHH3876 produjo la zona de inhibición más grande indicando más producto o producto de mayor actividad en comparación con pHH3875.

Selección por HTP de variantes de la Plectasina

Para optimizar adicionalmente la actividad antimicrobiana de la Plectasina, se desea un ensayo de alto rendimiento (HTP) para la actividad. Para establecer tal sistema, las células de levadura que contenían el plásmido de control, pHH3902, o los dos plásmidos de expresión de la Plectasina, pHH3875 y pHH3876, fueron hechos crecer en placas de microtitulación de 96 pocillos. A una densidad de la célula razonable, cada 5 o 20 microlitros del cultivo de levadura fueron eliminados de la placa de microtitulación y usados en un ensayo de difusión radial como se describe en el ejemplo 5. Nuevamente, las zonas de claridad en la placa de la prueba de difusión radial fueron evidentes de los sobrenadantes originados a partir de las dos cepas productoras de Plectasina, pHH3875 y pHH3876. Como se ha observado anteriormente, las zonas de compensación fueron mayores para los sobrenadantes originados a partir de pHH3876. Ninguna zona de compensación fue observada del plásmido del control. Esto indica que este simple ensayo de HTP puede diferenciar entre células de levadura que expresan niveles diferentes de actividades antimicrobianas, y es realizable para seleccionar variantes de Plectasina con las actividades deseadas.

Ejemplo 7

Construcción de producción de la levadura inducible y sistema de selección por HTP para Plectasina - construcción de pYES2-3902, pHH3886 (plectasina) y pHH3887 (Pro-plectasina)

Para evaluar sistemas de expresión inducibles y el potencial para el establecimiento de un sistema de selección por HTP para identificar variantes de la plectasina con bioactividad mejorada, los vectores de expresión inducibles que codifican la Plectasina y la pro-plectasina fueron construidos usando pYES2.

pYES2 (Invitrogen) es un vector de 5.9 kb diseñado para la expresión inducible de proteínas y péptidos recombinantes en *Saccharomyces cerevisiae*. El vector contiene características tales como un promotor GAL1 de levadura para expresión de alto nivel inducible por galactosa y represión por glucosa. La prototrofia del uracilo y la resistencia a la ampicilina son empleadas para la selección de transformantes en la levadura y la célula de *E. coli*, respectivamente.

Tres plásmidos fueron construidos; un plásmido de control, pYES-3902, y dos plásmidos que codifican Plectasina, pHH3886 y pHH3887.

Como pYES2 es un vector de no fusión, las regiones del alfa-líder enteras de pHH3902, pHH3875 y pHH3876 fueron amplificadas por PCR en una reacción PCR estándar. Los fragmentos fueron realizados en un 2% gel de agarosa, purificados usando un kit de purificación Qiagen, y restringidos con HindIII y XbaI, y ligados en los sitios correspondientes en el plásmido pYES2. Esto posiciona al alfa-líder delante del promotor GAL1. La mezcla de ligación fue transformada en *E. coli* competente. Los transformantes fueron recolocados en líneas y varios clones individuales analizados por plásmidos con un inserto del tamaño correcto. La verificación final fue hecha por secuenciación del ADN

ES 2 275 011 T3

usando los cebadores AOP107 y AOP446. Los plásmidos se designan pYES2-3902 (control), pHH3886 (plectasina) y pHH3887 (Pro-plectasina).

Cebador AOP107: caata taaa aaget agctt tccg: (SEC ID NO:22)
 Cebador AOP446:: ccggc tgaag ctgct atcgg : (SEC ID NO:23)

Los tres plásmidos, pYES-3902, pHH3886 y pHH3887 fueron transformados en la cepa JG169 de levadura, y colocados en placas conteniendo glucosa (0.5%)/galactosa (1.5%). La glucosa asegura la formación de colonias de un tamaño adecuado y después de la depleción de la glucosa, la galactosa asegura un crecimiento adicional, la inducción de la transcripción y la producción correspondiente de Plectasina. Después de formarse las colonias, un recubrimiento (aprox. 106 cfu) de una cepa indicadora, *B. subtilis*, cubrió las colonias y las placas fueron incubadas adicionalmente durante toda la noche. Como se ha visto con los otros plásmidos de levadura anteriormente descritos, la cepa de levadura que contiene el plásmido de control no resultó en una zona de compensación, mientras que pHH3886 y pHH3887 ambos dieron lugar a las zonas de claridad. Las zonas de claridad más grandes fueron observadas con pHH3887 que codifica Pro-plectasina.

Ejemplo 8

Construcción de la producción de la levadura inducible y sistema de selección por HTP para plectasina - construcción de bibliotecas de Plectasina mutada

Las bibliotecas de Plectasina mutada fueron construidas usando PCR con tendencia al error. Los fragmentos de ADN mutado de forma aleatoria fueron generados usando los cebadores pYES-mut y pHH3885-Rev y sea el molde pHH3875 (Pro-plectasina) o sea pHH3876 (Plectasina) en una reacción PCR que contenía 0.5 mM de MnCl₂.

Cebador pYES-mut:

taaatactac tattgccagc attgctgcta aagaagaagg ggtatcgatg gccaaagaga (SEC ID NO:24)

Cebador pHH3885-Rev:

tgtaagcgtg acataactaa ttacatgatg cgccctcta ga (SEC ID NO:25)

Los fragmentos fueron realizados en un 2% de gel de agarosa, purificados usando un kit de purificación Qiagen e insertados en el plásmido pYES2-3902. Los plásmidos fueron sometidos a electroporación en las células de levadura competentes JG169.

Las dos bibliotecas diferentes fueron colocadas en placas de agar grandes (23 cm x 23 cm) conteniendo un 0.5% de glucosa y un 1.5% de galactosa. Tras la incubación a 30 grados Celsius durante 2 días, las placas de la biblioteca fueron cubiertas con una capa de agarosa fina que contenía aprox. 10⁷ cfu de *B. subtilis*. Las placas fueron incubadas adicionalmente durante 24 horas a 30 grados Celsius. Aproximadamente 10,000 colonias fueron evaluadas. Las colonias de levadura que daban lugar a zonas de claridad significantes fueron aisladas para una caracterización adicional.

Depósito de material biológico

El material biológico siguiente ha sido depositado según las condiciones del tratado de Budapest con el Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS), Uppsalalaan 8,3584 CT Utrecht, Holanda (de forma alternativa P.O.Box 85167,3508 AD Utrecht, Holanda), y provisto del número de accesión siguiente:

Depósito	Número de accesión	Fecha de depósito
<i>Pseudoplectania nigrella</i>	CBS 444.97	28 Enero 1997

El depósito fue realizado por novo Nordisk A/S, y fue más tarde asignado a Novozymes A/S.

Clasificación de *Pseudoplectania nigrella*

Eukaryota; Fungi; Ascomycota; Pezizomycotina; Pezizomycetes; Pezizales; Sarcosomataceae; Pseudoplectania.

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido con actividad antimicrobiana, seleccionado del grupo que consiste en:

(a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 65% de identidad con los aminoácidos 1 a 40 de la SEC ID NO:2;

(b) un polipéptido que está codificado por una secuencia de nucleótidos que se hibrida bajo condiciones de astringencia media, usando 0.2 x SSC a 42°C para el lavado, con una sonda de polinucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

(i) la cadena complementaria de los nucleótidos 166 a 285 de la SEC ID NO:1,

(ii) la cadena complementaria de los nucleótidos 70 a 285 de la SEC ID NO:1, y

(iii) la cadena complementaria de los nucleótidos 1 a 285 de la SEC ID NO:1; y

(c) un fragmento de (a) o (b) con actividad antimicrobiana.

2. Polipéptido según la reivindicación 1, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70% de identidad con los aminoácidos 1 a 40 de la SEC ID NO:2, preferiblemente al menos el 80% de identidad, al menos el 85% de identidad, al menos el 90% de identidad, al menos el 95% de identidad, o al menos el 99% de identidad con los aminoácidos 1 a 40 de la SEC ID NO:2.

3. Polipéptido según la reivindicación 2, que comprende los aminoácidos 1 a 40 de la SEC ID NO:2.

4. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que consiste en los aminoácidos 1 a 40 de la SEC ID NO:2.

5. Polipéptido según la reivindicación 1, que está codificado por una secuencia de nucleótidos que se hibrida bajo condiciones de astringencia media-alta, usando 0.2 x SSC a 55°C para el lavado, preferiblemente bajo condiciones de astringencia alta, usando 0.1 x SSC a 60°C para el lavado, con una sonda de polinucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

(i) la cadena complementaria de los nucleótidos 166 a 285 de la SEC ID NO:1,

(ii) la cadena complementaria de los nucleótidos 70 a 285 de la SEC ID NO:1, y

(iii) la cadena complementaria de los nucleótidos 1 a 285 de la SEC ID NO:1.

6. Polipéptido según la reivindicación 5, que está codificado por una secuencia de nucleótidos que se hibrida bajo condiciones de astringencia media-alta, usando 0.2 x SSC a 55°C para el lavado, preferiblemente bajo condiciones de astringencia altas, usando 0.1 x SSC a 60°C para el lavado, con una sonda de polinucleótidos que es la cadena complementaria de los nucleótidos 166 a 285 de la SEC ID NO:1.

7. Polinucleótido con una secuencia de nucleótidos que codifica para el polipéptido definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-6.

8. Constructo de ácidos nucleicos que comprende la secuencia de nucleótidos definida en la reivindicación 7 operativamente enlazada a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un huésped adecuado.

9. Vector de expresión recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos definido en la reivindicación 8.

10. Célula huésped recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos definido en la reivindicación 8.

11. Método para la producción de un polipéptido tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-6, el método comprendiendo:

(a) el cultivo de una cepa, que en su forma de tipo salvaje es capaz de producir el polipéptido, para producir el polipéptido; y

(b) la recuperación del polipéptido.

12. Método para la producción de un polipéptido tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-6, el método comprendiendo:

ES 2 275 011 T3

(a) el cultivo de una célula huésped recombinante tal y como se define en la reivindicación 10 bajo las condiciones propicias para la producción del polipéptido; y

(b) la recuperación del polipéptido.

5

13. Método para matar o inhibir el crecimiento de células microbianas que no es un método para el tratamiento terapéutico para el cuerpo humano o animal, que comprende el contacto de las células microbianas con un polipéptido antimicrobiano tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-6.

10

14. Polipéptido antimicrobiano tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para el uso como un medicamento.

15

15. Uso de un polipéptido antimicrobiano tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en la preparación de un agente terapéutico humano o veterinario para el tratamiento de una infección microbiana o para el uso profiláctico.

16. Uso de al menos un polipéptido antimicrobiano tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en alimentos para animales.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 275 011 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Novozymes A/S
 <120> Polipéptidos antimicrobianos
 <130> 10212-WO
 <160> 25
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 288
 <212> ADN
 <213> *Pseudoplectania nigrella*
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(285)
 <223>
 <220>
 <221> sig_péptido
 <222> (1)..(69)
 <223>
 <220>
 <221> mat_péptido
 <222> (166)..()
 <223>
 <400> 1
 atg caa ttt acc acc atc ctc tcc atc ggt atc acc gtc ttc gga ctt 48
 Met Gln Phe Thr Thr Ile Leu Ser Ile Gly Ile Thr Val Phe Gly Leu
 -55 -50 -45 -40
 ctc aac acc gga gcc ttt gca gca ccc cag cct gtt ccc gag gct tac 96
 Leu Asn Thr Gly Ala Phe Ala Ala Pro Gln Pro Val Pro Glu Ala Tyr
 -35 -30 -25
 gct gtt tct gat ccc gag gct cat cct gac gat ttt gct ggt atg gat 144
 Ala Val Ser Asp Pro Glu Ala His Pro Asp Asp Phe Ala Gly Met Asp
 -20 -15 -10
 gcg aac caa ctt cag aaa cgt gga ttt gga tgc aat ggt cct tgg gat 192
 Ala Asn Gln Leu Gln Lys Arg Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp
 -5 -1 1 5
 gag gat gat atg cag tgc cac aat cac tgc aag tct att aag ggt tac 240
 Glu Asp Asp Met Gln Cys His Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr
 10 15 20 25
 aag gga ggt tat tgt gct aag ggg ggc ttt gtt tgc aag tgt tac tag 288
 Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 30 35 40

ES 2 275 011 T3

<210> 2
 <211> 95
 <212> PRT
 5 <213> *Pseudoplectania nigrella*
 <400> 2
 10 Met Gln Phe Thr Thr Ile Leu Ser Ile Gly Ile Thr Val Phe Gly Leu
 -55 -50 -45 -40
 15 Leu Asn Thr Gly Ala Phe Ala Ala Pro Gln Pro Val Pro Glu Ala Tyr
 -35 -30 -25
 20 Ala Val Ser Asp Pro Glu Ala His Pro Asp Asp Phe Ala Gly Met Asp
 -20 -15 -10
 25 Ala Asn Gln Leu Gln Lys Arg Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp
 -5 -1 1 5
 30 Glu Asp Asp Met Gln Cys His Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr
 10 15 20 25
 35 Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 30 35 40
 <210> 3
 <211> 95
 40 <212> PRT
 <213> *Pseudoplectania nigrella*
 <220>
 45 <221> SEÑAL
 <222> (1)..(23)
 <223>
 <220>
 50 <221> PROPEP
 <222> (24)..(55)
 <223>
 <220>
 55 <221> PÉPTIDO
 <222> (56)..(95)
 <223>
 60
 65

ES 2 275 011 T3

 $\langle 400 \rangle$ 3

5	Met	Gln	Phe	Thr	Thr	Ile	Leu	Ser	Ile	Gly	Ile	Thr	Val	Phe	Gly	Leu
	1				5					10					15	
10	Leu	Asn	Thr	Gly	Ala	Phe	Ala	Ala	Pro	Gln	Pro	Val	Pro	Glu	Ala	Tyr
				20					25					30		
15	Ala	Val	Ser	Asp	Pro	Glu	Ala	His	Pro	Asp	Asp	Phe	Ala	Gly	Met	Asp
			35					40					45			
20	Ala	Asn	Gln	Leu	Gln	Lys	Arg	Gly	Phe	Gly	Cys	Asn	Gly	Pro	Trp	Asp
		50					55					60				
25	Glu	Asp	Asp	Met	Gln	Cys	His	Asn	His	Cys	Lys	Ser	Ile	Lys	Gly	Tyr
	65					70					75					80
30	Lys	Gly	Gly	Tyr	Cys	Ala	Lys	Gly	Gly	Phe	Val	Cys	Lys	Cys	Tyr	
					85					90					95	

<210> 4

35 $\langle 211 \rangle$ 2403

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

40 <223> Vector pMHas5

45

50

55

60

65

ES 2 275 011 T3

<400> 4

5	cgataagcta gcttcacgct gccgcaagca ctacggggcg aagggtctgt aaagggaagcg	60
	gaacacgtag aaagccagtc cgcagaaacg gtgctgaccc cggatgaatg tcagctactg	120
10	ggctatcttg acaaggga aaagcaagcg aaagagaag caggtagctt gcagtgggct	180
	tacatggcga tagctagact gggcggtttt atggacagca agcgaacgg aattgccagc	240
15	tggggcgccc tctggttaagg ttgggaagcc ctgcaaatg aactggatgg ctttcttgcc	300
	gccaaaggatc tgatggcgca ggggatcaag atctgatcaa gagacaggat gaggatcgtt	360
20	tgcctgatt gaacaagatg gattgcacgc aggttctccg gccgcttggg tggagaggct	420
25	attcggtat gactgggca aacagacaat cggctgctct gatgccgcg tgttcggct	480
	gtcagcgag gggcgcccg ttcttcttgt caagaccgac ctgtccggtg cctgaatga	540
30	actccaagac gaggcagcgc ggctatcttg gtggtgcacg accggcgctt cttgcgcagc	600
35	tgtgtctgac gttgtcactg aagcgggaag ggactggctg ctattgggag aagtgcgggg	660
	gcaggatctc ctgtcatctc accttgctcc tggcgagaaa gtatccatca tggctgatgc	720
40	aatgcggcgg ctgcatacgc ttgatccggc taacctgcca ttgcaccacc aagcgaaaca	780
45	tgcctcgag cgagcacgta ctgggatgga agccggtctt gtgatcagg atgattctga	840
	cgaagagcat caggggctcg cgcagccga actgttcgct aggtcgaagg cgcggatgcc	900
50	cgacggcgag gatctctgctg tgacctatgg cgatgcctgc ttgccgaata tcatggtgga	960
55	aaatggcogo ttttctggat tcatcgactg tggcggctg ggtgtggcgg accgctatca	1020
	ggacatagcg ttggctaacc gtgatattgc tgaagagctt ggcggcgaat gggctgaccg	1080
60	cttcctctgt ctttacggta tgcgcgtcc cgattcgcag cgcctgcct tctatcgct	1140

65

ES 2 275 011 T3

1 tcttgaacgag ttcttctgag cgggactctg ggggttcgca tgataagctg tcaaacatga 1200
 5 gaattacaaac ttatatcgtg tggggctgac ttcaggtgct acatttgag agataaattg 1260
 cactgaattc tagaaatatt ttatctgatt aataagatga tcttcttgag atcgttttgg 1320
 10 tctgcgcgta atctcttgct ctgaaaacga aaaaacggcc ttgcagggcg gtttttcgaa 1380
 ggttctctga gctacaaact ctttgaaacg aggttaactgg cttggaggag cgcagtcacc 1440
 15 aaaaacttgct ctttcagttt agccttaacc ggcgcagac ttcaagacta actcctctaa 1500
 20 atcaattacc agtggctgct gccagtggtg cttctgcacg tctttccggg ttggactcaa 1560
 gacgatagtt accggataag ggcagcggt cggactgaac ggggggttcg tgcatacagc 1620
 25 ccagcttgga gogaactgcc taccgggac tgagtgtcag gcgtggaatg agacaaacgc 1680
 gcccataaca gcggaatgac accggtaaac cgaaaggcag gaacaggaga gcgcacgagg 1740
 30 gagccgccag gggaaacgac tggatctttt atagtctctg cgggtttcgc caccactgat 1800
 35 ttgagcgta gatttcgtga tgcctgtcag gggggcgag cctatggaaa aacggctttg 1860
 ccttctttcc tgcgttatcc cctgattctg tggataaacg tattaccgac tttgagtggg 1920
 40 ctgataccgc tcgccgcagc cgaaacgac aggcagcga gtcagtggc gaggaagcgg 1980
 45 aagagggccc aatacgcaaa ccgcctctcc ccgcgcgttg gccgattcat taatgcagct 2040
 ggcacgacag gtttcccgac tggaaagcgg gcagtggcgg caacgcaatt aatgtgagtt 2100
 50 agctcactca ttaggcaccc caggctttac actttatgct tcgggtcgt atgttctgtg 2160
 gaattgtgag cggataacaa tttcacacag gaattcacag ctatgctaga gcggccgctc 2220
 55 gacctgcagg catgcaagct tggcactggc cgtcgtttta caacgtcgtg actgggaaaa 2280
 60 ccttggcggt acccaactta atgccttgc agcacatccc cctttcgcca gctggcgtaa 2340
 tagcgaagag gcccgcaacc atcgcccttc caacagttg cgcagcctga atggcgaatg 2400

<210> 5

<211> 303

ES 2 275 011 T3

<212> ADN

<213> *Pseudoplectania nigrella*

5 <400> 5

ggatccacca tgcattttac caccatcctc tocatcggtc tcacogtctc cggacttctc 60

10 aacaccggag cctttgcagc accccagcct gtcccgagg cttacgctgt ttctgatccc 120

gaggctcctc ctgacgattt tgctgggtatg gatgcgaacc aatttcagaa acgtggattt 180

15 ggatgcaatg gtccctggga tgaggatgat atgcagtgcc acaatcactg caagtctatt 240

aagggttaca agggagggtta ttgtgctaag gggggctttg ttgcaagtg ttactagctc 300

20 gag 303

<210> 6

25 <211> 361

<212> ADN

<213> *Pseudoplectania nigrella*

30 <400> 6

ggatccacca tgcattttac caccatcctc tocatcggtc tcacogtctc cggacttctc 60

35 aacaccggag cctttgcagc accccagcct gtcccgagg cttacgctgt ttctgatccc 120

gaggctcctc ctgacgattt tgctgggtatg gatgcgaacc aatttcagaa acgtggattt 180

40 ggatgcaatg gtccctggga tgaggatgat atgcagtgcc acaagtgaaga atcacttata 240

45 actatagatt aagccaagag tattggaact gatgataaat agtcaactgca agtctattaa 300

gggttacaag ggagggttatt gtgctaaggg gggcctttgt tgcagtgtt actagctoga 360

50 g 361

<210> 7

55 <211> 35

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> Cebador 178

<400> 7

65 tctggatcca ccatgaatt taccaccatc ctctc

35

ES 2 275 011 T3

<210> 8
 <211> 32
 <212> ADN
 5 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> cebador 179
 10 <400> 8
 tctctcgagc tagtaacact tgcaaacaaa gc 32
 15 <210> 9
 <211> 34
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador DR34F
 25 <400> 9
 ccggccatgg gatttgatg caatggctct tggg 34
 30 <210> 10
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 35 <220>
 <223> cebador DR34R
 <400> 10
 40 gccgtctaga gccatctagt aacacttgca aacaaagccc cccttagc 48
 <210> 11
 45 <211> 41
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 <220>
 50 <223> met-plectasina
 <400> 11
 55 **Met Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp Glu Asp Asp Met Gln Cys**
1 5 10 15
 60 **His Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys Ala**
20 25 30
 65 **Lys Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr**
35 40

ES 2 275 011 T3

<210> 12
 <211> 60
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador1
 10 <400> 12
 attattcaga tgctggatcc gaaaaacctg cgtcgcatta tccgcaaagg catccatc 60
 15 <210> 13
 <211> 62
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Cebador2
 25 <400> 13
 aataatctcg agttattagc catatTTTT aatgatatgg atgcctttgc ggataatgcg 60
 ac 62
 30 <210> 14
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador3
 40 <400> 14
 tgctagtatt tgctcagcgg 20
 45 <210> 15
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Cebador4
 <400> 15
 55 accgtagtgtg cgcccatcg 19
 <210> 16
 60 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 65 <223> cebador A

ES 2 275 011 T3

	<400> 16	
	agcgtttgcg gccgcgatcc	20
5	<210> 17	
	<211> 21	
	<212> ADN	
10	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador B	
15	<400> 17	
	ttattcggtc gaaaaggatc c	21
20	<210> 18	
	<211> 55	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> cebador pHH3875-Forw	
30	<400> 18	
	gaaggggtat cgatggctaa gagaggattt ggatgcaatg gtccttgga tgagg	55
35	<210> 19	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador pHH3875-Rev	
	<400> 19	
45	cttagtttct agactagtaa cacttgcaaa caaagccccc c	41
	<210> 20	
50	<211> 53	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> cebador pHH3876-Forw	
	<400> 20	
60	gaaggggtat cgatggctaa gagagcacc cagcctgttc ccgaggctta cgc	53
	<210> 21	
	<211> 41	
65	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	

ES 2 275 011 T3

	<220>		
	<223> Cebador pHH3876-Rev		
5	<400> 21		
	cttagtttct agactagtaa cacttgcaaa caaagccccc c		41
10	<210> 22		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> Cebador AOP107		
	<400> 22		
20	caatataaaa aagctagctt tccg		24
	<210> 23		
25	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
30	<223> Cebador AOP446		
	<400> 23		
35	ccggctgaag ctgctatcgg		20
	<210> 24		
40	<211> 59		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
45	<223> cebador pYES-mut		
	<400> 24		
50	taaatactac tattgccagc attgctgcta aagaagaagg ggtatcgatg gccaaagaga		59
	<210> 25		
	<211> 42		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador pHH3885-Rev		
60	<400> 25		
65	tgtaagcgtg acataactaa ttacatgatg cggccctcta ga		42