

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 221**

51 Int. Cl.:
C12N 5/10 (2006.01)
A23K 1/17 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 9/90 (2006.01)
A23K 1/00 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)
C07K 1/107 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04762825 .0**
96 Fecha de presentación: **13.09.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1680503**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.07.2006**

54 Título: **PRODUCCIÓN RECOMBINANTE DE AGENTES ANTIMICROBIANOS.**

30 Prioridad:
11.09.2003 DK 200301310

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.11.2011

73 Titular/es:
NOVOZYMES ADENIUM BIOTECH A/S
KROGSHOEJVEJ 36
2880 BAGSVAERD, DK

72 Inventor/es:
JENSEN, Ejner, Bech; HÖGENHAUG, Hans-Henrik,
Kristensen;
HANSEN, Peter, Kamp; PEDERSEN, Poul, Erik y
MYGIND, Per, Holse

74 Agente: **Tomas Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 368 221 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

Producción recombinante de agentes antimicrobianos

Campo de la invención

5 [0001] La presente invención se refiere al campo de la producción recombinante de agentes antimicrobianos, usando un dominio de protección que abarca entre 1 y 100 residuos de aminoácidos, y donde al menos el 50% de los residuos de aminoácidos comprendidos en el dominio son D (asparagina, Asp) y/o E (glutamina, Glu).

Antecedentes de la invenciónAntecedentes de la técnica

10 [0002] WO 96/14413 divulga varios vectores de expresión usados para expresar lactoferrina humana recombinante en varias cepas de *Aspergillus*. Un plásmido de expresión, para la expresión en *Aspergillus awamori*, contiene el promotor de glucoamilasa, secuencia de señal, y secuencia que codifica 498 aminoácidos de la endógena proglucoamilasa de *Aspergillus awamori*, fusionada a la lactoferrina humana. Para la expresión de lactoferrina humana en *Aspergillus oryzae*, el plásmido de expresión incorpora el gen AMY II de *Aspergillus oryzae* que codifica el promotor de alfa-amilasa, la secuencia de señal secretora y el primer codón de alfa-amilasa madura. Para la expresión de lactoferrina humana en *Aspergillus nidulans*, el plásmido de expresión incorpora 300 bp de la secuencia flanqueadora 5' del gen alcA de *A. nidulans* conteniendo todos los elementos reguladores necesarios para la expresión genética controlada, incluyendo el promotor de alcohol deshidrogenasa de *A. nidulans*.

15 [0003] WO 96/28559 divulga la expresión de determinadas proteínas antimicrobianas catiónicas como proteínas de fusión con una parte aniónica para la supresión de la actividad antimicrobiana de la proteína catiónica. Ejemplos de péptidos portadores aniónicos son la glutatión S-transferasa, la proteína A de estafilococo áureo, dos dominios de unión de IgG sintéticos (ZZ) de proteína A, y proteína de membrana externa F de *Pseudomonas aeruginosa*.

20 [0004] WO 98/54336 divulga la expresión de determinadas proteínas antimicrobianas como proteínas de fusión con un péptido ácido cargado negativamente con al menos dos residuos de cisteína.

25 [0005] WO 00/75344 divulga la expresión de un polipéptido exógeno como fusiones con pectato liasa usando varios enlaces, por ejemplo (repeticiones de) PEPT (SEC ID n°: 79), EPTP (SEC ID n°: 80), PTEP (SEC ID n°: 81), TPEP (SEC ID n°: 82) o IEGR (SEC ID n°: 83). Ejemplos de polipéptidos exógenos son la insulina humana de cadena única, GLP1 humano, y varias alfa-amilasas.

30 [0006] Okamoto et al en Plant Cell Physiol. 39(1):57-63 (1998) divulga la expresión del péptido antimicrobiano Sarcotoxin IA mediante fusión de GUS en plantas de tabaco transgénicas. GUS designa la secuencia codificante de proteína de beta-glucuronidasa.

[0007] Es un objetivo de la presente invención proporcionar métodos mejorados para la producción de agentes antimicrobianos.

Resumen de la invención

35 [0008] En un primer aspecto, la invención se refiere al uso, en la producción recombinante de un péptido antimicrobiano, de un dominio de extinción que sirve para desactivar temporal y reversiblemente el péptido durante su expresión, donde el dominio de extinción se funde al péptido antimicrobiano, donde el dominio de extinción engloba entre 1 y 100 residuos de aminoácidos, y donde al menos el 50% de los residuos de aminoácidos comprendidos en el dominio de extinción son D y/o E. La invención también se refiere a un método de identificación de tales dominios de extinción.

40 [0009] En un segundo aspecto, la invención se refiere a una célula huésped microbiana recombinante comprendiendo una primera secuencia de ácidos nucleicos que codifica un agente antimicrobiano, una segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica una enzima, y una secuencia de ADN que codifica un péptido de protección de la invención, en el que el polipéptido de protección se fusiona con el péptido antimicrobiano y en el que el efecto antimicrobiano inhibe el crecimiento de la célula huésped. Cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos, preferiblemente ambas, se pueden integrar en el cromosoma de la célula huésped, o pueden estar presentes en una o más entidades extracromosómicas.

45 [0010] En un tercer aspecto, la invención se refiere a un constructo de ácidos nucleicos comprendiendo una primera secuencia de ácidos nucleicos que codifica un agente antimicrobiano, y una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica una enzima, unida operativamente a una o más secuencias de control que dirigen la expresión de la enzima y el agente antimicrobiano en un huésped de expresión adecuado, donde la segunda secuencia de ácidos nucleicos es heteróloga al huésped de expresión; y una secuencia de ADN que codifica un péptido de protección de la invención, en el que el polipéptido de protección se fusiona al péptido antimicrobiano y en el que el efecto antimicrobiano inhibe el crecimiento de la célula huésped.

50 [0011] En un cuarto aspecto, la invención se refiere a un método para producir la enzima y/o el agente antimicrobiano mediante el uso de la célula huésped recombinante de la invención.

55

[0012] En un quinto aspecto, la invención se refiere a productos de fusión comprendiendo una enzima, un agente antimicrobiano, un enlace escindible que conecta la enzima y el agente antimicrobiano, y un péptido de protección de la invención, en el que el polipéptido de protección se fusiona al péptido antimicrobiano y donde el efecto antimicrobiano inhibe el crecimiento de la célula huésped, al igual que su uso en alimento para animales y aditivos de pienso animal.

[0013] En un sexto aspecto, la invención se refiere al uso de la coexpresión de un péptido antimicrobiano y una enzima y un péptido de protección de la invención, en el que el polipéptido de protección se fusiona al péptido antimicrobiano y en el que el efecto antimicrobiano inhibe el crecimiento de la célula huésped, como una herramienta para mejorar el rendimiento del péptido y/o para mejorar la economía de la producción total.

10 Descripción detallada de la invención

[0014] Generalmente, siempre que se menciona "un" aquí significa "al menos uno," por ejemplo en el contexto de la primera y la segunda secuencia de ácidos nucleicos, el agente antimicrobiano, la enzima, y las varias construcciones de ADN.

[0015] La presente invención se refiere a la coexpresión de al menos una enzima con al menos un agente antimicrobiano usando un péptido de protección (un dominio de extinción), en el que el péptido de protección se fusiona al péptido antimicrobiano, en el que el péptido de protección engloba entre 1 y 100 residuos de aminoácidos, y en el que al menos el 50% de los residuos de aminoácidos son D y/o E (Asp y/o Glu). La enzima y el agente antimicrobiano se pueden coexpresar del cromosoma de las células huéspedes, de distintas construcciones de ADN, de una construcción de ADN, o usando una mezcla de estas técnicas. Al usar construcciones diferentes, se pueden utilizar diferentes marcadores de selección, y diferentes orígenes de replicación. Cuando se usa sólo una construcción, los genes se pueden expresar a partir de uno o más promotores. Si se clona bajo la regulación de un promotor (di o multicistrónico), el orden en que los genes son clonados puede afectar a los niveles de expresión de las proteínas. La enzima y el agente antimicrobiano pueden también ser expresados como una proteína de fusión, es decir, que el gen que codifica la enzima se ha fusionado en el marco del gen que codifica el agente antimicrobiano. Si el agente antimicrobiano influyera negativamente en el crecimiento de la célula huésped elegida, la actividad antimicrobiana se extinguiría mediante la expresión del péptido como una fusión con un péptido de protección (un dominio de extinción), donde el péptido de protección engloba entre 1 y 100 residuos de aminoácidos, y donde al menos el 50% de los residuos de aminoácidos son D y/o E (Asp y/o Glu).

Agente antimicrobiano

[0016] En el presente contexto, el término un agente antimicrobiano designa un compuesto con actividad antimicrobiana (ver a continuación). Ejemplos de agentes antimicrobianos son los péptidos antimicrobianos y las enzimas antimicrobianas.

[0017] Ejemplos de enzimas antimicrobianas son las enzimas que disgregan la pared celular, generan compuestos tóxicos, eliminan nutrientes esenciales, o desactivan compuestos esenciales para el crecimiento de microorganismos indeseados. La lisozima (una enzima con una actividad de 1,4 beta acetilmuramidasa) es un ejemplo de una enzima antimicrobiana que disgrega la pared celular de bacterias Gram positivas. Las oxidasas, tales como la glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4), genera peróxido de hidrógeno, que es tóxico para muchos microorganismos indeseados. Otros ejemplos de enzimas antimicrobianas que generan compuestos tóxicos son xantina oxidasa, lactoperoxidasa, lipasa, mieloperoxidasa, y fosfolipasa. La glucosa oxidasa es también un ejemplo de una enzima que elimina nutrientes esenciales, a saber oxígeno, impidiendo así el crecimiento de microorganismos aeróbicos indeseados. Finalmente, la sulfhidrilo oxidasa es un ejemplo de una enzima antimicrobiana que es capaz de desactivar compuestos esenciales, es decir, aquellas enzimas esenciales del microorganismo indeseado, la actividad de la cual depende de los grupos intactos de sulfhidrilo. Estas enzimas son muy conocidas y han sido producidas de forma recombinante, ver por ejemplo la lisozima y la glucosa oxidasa Bio/Technology 8, 1990, 741-745, y WO 89/12675, respectivamente.

[0018] En una forma de realización particular, la enzima antimicrobiana se selecciona de entre lisozimas, glucosa oxidasas, oxidasas de sulfhidrilo, peroxidasas, y xantina oxidasas, preferiblemente la enzima antimicrobiana es una lisozima y/o una glucosa oxidasa.

[0019] Volviendo ahora a los péptidos antimicrobianos, en una forma de realización particular, los péptidos antimicrobianos para su uso según la invención engloban no más de 100 aminoácidos.

[0020] La expresión "engloba no más de" un cierto número de aminoácidos (p. ej. 100) significa que el número de aminoácidos en la secuencia peptídica es inferior o igual a 100.

[0021] En formas de realización particulares, el péptido comprende, o tiene, o consiste en no más de 100 aminoácidos (y viceversa para las figuras de límite superior adicionales mencionadas abajo).

[0022] En otras formas de realización más particulares, el péptido engloba no más de 90, 80, 70, 60, 50, o no más de 40 aminoácidos.

[0023] El péptido puede también ser designado un oligopéptido.

[0024] En otra forma de realización particular, el péptido engloba al menos 3 aminoácidos.

[0025] La expresión "engloba al menos" un cierto número de aminoácidos (p. ej. 3) significa que el número de aminoácidos en la secuencia peptídica es superior o igual a 3.

[0026] En formas de realización particulares adicionales, el péptido engloba al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o al menos 20 aminoácidos.

5 [0027] En formas de realización todavía más particulares, el péptido comprende, o tiene, o consiste en al menos 3 aminoácidos (y viceversa para las figuras de límite inferior adicionales mencionadas anteriormente).

[0028] Ejemplos de péptidos antimicrobianos para su uso según la invención se enumeran a continuación.

Actividad antimicrobiana

10 [0029] El término "actividad antimicrobiana" se define aquí como una actividad que es capaz de matar o inhibir el crecimiento de células microbianas. En el contexto de la presente invención con el término "antimicrobiano" se entiende que hay un bactericida y/o un efecto fungistático y/o fungicida y/o bacteriostático y/o un efecto virucida.

15 [0030] 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 células bacterianas. El término "fungicida" debe ser entendido como capaz de matar células micóticas. El término "fungistático" debe ser entendido como capaz de inhibir el crecimiento fúngico, es decir, inhibir el crecimiento fúngico. El término "virucida" debe ser entendido como capaz de inactivar virus. El término "células microbianas" denota células bacterianas o micóticas (incluyendo levaduras).

[0031] En el contexto de la presente invención con el término "inhibir el crecimiento de células microbianas" se entiende que las células están en un estado de no crecimiento, es decir, que no son capaces de propagarse.

20 [0032] Para los efectos de la presente invención, la actividad antimicrobiana se puede determinar según el procedimiento descrito por Lehrer et al., Journal of Immunological Methods, Vol. 137 (2) págs. 167-174 (1991).

25 [0033] Péptidos, y/o enzimas, que tienen actividad antimicrobiana pueden ser capaces de reducir el número de células vivas de *Escherichia coli* (DSM 1576) a 1/100 después de 8 horas (preferiblemente después de 4 horas, más preferiblemente después de 2 horas, de la forma más preferible después de 1 hora, y en particular después de 30 minutos de incubación a 20°C en una solución acuosa al 25% (porcentaje en peso); preferiblemente en una solución acuosa al 10% (porcentaje en peso); más preferiblemente en una solución acuosa al 5% (porcentaje en peso); incluso más preferiblemente en una solución acuosa al 1% (porcentaje en peso); de la forma más preferible en una solución acuosa al 0,5% (porcentaje en peso); y en particular en una solución acuosa al 0,1% (porcentaje en peso) de los péptidos con actividad antimicrobiana.

30 [0034] Péptidos, y/o enzimas, que tienen actividad antimicrobiana pueden también ser capaces de inhibir la excrecencia de *Escherichia coli* (DSM 1576) durante 24 horas a 25°C en un sustrato de crecimiento microbiano, cuando se añade en una concentración de 1000 ppm; preferiblemente cuando se añade en una concentración de 500 ppm; más preferiblemente cuando se añade en una concentración de 250 ppm; incluso más preferiblemente cuando se añade en una concentración de 100 ppm; más preferiblemente cuando se añade en una concentración de 50 ppm; y en particular cuando se añade en una concentración de 25 ppm.

35 [0035] Péptidos, y/o enzimas, que tienen actividad antimicrobiana pueden ser capaces de reducir el número de células vivas de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) a 1/100 después de 30 min. de incubación a 20°C en una solución acuosa de 25%(m/m); preferiblemente en una solución acuosa de 10%(m/m); más preferiblemente en una solución acuosa de 5%(m/m) incluso más preferiblemente en una solución acuosa de 1%(m/m); de la forma más preferible en una solución acuosa de 0.5%(m/m); y en particular en una solución acuosa de 0.1%(m/m) de los péptidos con actividad antimicrobiana.

40 [0036] Péptidos, y/o enzimas, que tienen actividad antimicrobiana pueden también ser capaces de inhibir la excrecencia de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) durante 24 horas a 25°C en un sustrato de crecimiento microbiano, cuando se añade en una concentración de 1000 ppm; preferiblemente cuando se añade en una concentración de 500 ppm; más preferiblemente cuando se añade en una concentración de 250 ppm; incluso más preferiblemente cuando se añade en una concentración de 100 ppm; más preferiblemente cuando se añade en una concentración de 50 ppm; y en particular cuando se añade en una concentración de 25 ppm.

[0037] Un ensayo detallado de la actividad antimicrobiana se describe en el Ejemplo 1.

50 [0038] En una forma de realización particular, como alternativa a la actividad antimicrobiana, o además de la actividad antimicrobiana, el péptido, y/o la enzima, tiene un efecto inmunoestimulante. Este efecto inmunoestimulante se puede mediar a través de un aumento en la explosión oxidativa en macrófagos o alternativamente a través de una proliferación aumentada de linfocitos.

55 [0039] Ejemplos de péptidos antimicrobianos (PAMs) son péptidos antimicrobianos de membrana activa, o péptidos antimicrobianos afectando a/interactuando con objetivos intracelulares, p. ej. la unión a ADN celular. Generalmente tienen actividad hemolítica baja y/o citotoxicidad contra células mamíferas normales. La hemólisis se realiza en eritrocitos y se mide a través de la liberación de hemoglobina. La citotoxicidad se realiza en líneas celulares pertinentes, p. ej. células epiteliales cervicales humanas ME180 (ATCC HTB-33) o células epiteliales de pulmón

humano A549 (ATCC CCL-185) usando un ensayo de reducción de tetrazolio (Boeringer-Mannheim, Indianapolis, EEUU).

[0040] El péptido antimicrobiano para su uso según la invención es por lo general altamente catiónico e hidrofóbico. Contiene típicamente diferentes residuos de arginina y lisina, y puede no contener un único glutamato o aspartato.

5 Contiene normalmente una proporción grande de residuos hidrofóbicos. El péptido generalmente tiene una estructura anfifílica, con una superficie que es altamente positiva y la otra, hidrofóbica.

[0041] El péptido y la secuencia de nucleótidos codificante se puede derivar a partir de plantas, invertebrados, insectos, anfibios y mamíferos, o a partir de microorganismos tales como bacterias y hongos.

10 [0042] El péptido antimicrobiano puede actuar en membranas celulares de microorganismos objetivo, por ejemplo a través de unión no específica a la membrana, normalmente en una orientación paralela a la membrana, interactuando sólo con una cara a la bicapa.

15 [0043] El péptido antimicrobiano típicamente tiene una estructura perteneciente a una de las cinco clases mayores: hélice alfa, rico en cistina (de tipo defensina), beta lámina, péptidos con una composición inusual de aminoácidos regulares, y péptidos que contienen aminoácidos modificados y/o poco comunes. Todavía otros ejemplos son los péptidos antifúngicos (PAF) de *Aspergillus giganteus* y *Aspergillus niger*, por ejemplo aquellos descritos en WO 02/090384.

20 [0044] En formas de realización particulares, el péptido antimicrobiano para su uso según la invención es (i) un péptido de hélice alfa, (ii) péptido rico en cistina; (iii) un péptido de beta lámina; (iv) un péptido con una composición inusual de aminoácidos regulares; (v) un péptido conteniendo aminoácidos insólitos modificados; y/o (VI) un péptido antifúngico.

25 [0045] En otra forma de realización particular (vii), el péptido de hélice alfa se selecciona de entre la novispirina, magainina 1, magainina 2, cecropina A, cecropina B, cecropina P1; CAP18, andropina, clavanina A, clavanina AK, styelin D, styelin C, buforina II, y los péptidos antimicrobianos descritos en WO 02/000839, DK 2004 000800, PCT/DK2004/000399, y/o PCT/DK2004/000400; así como cualquier variante o fragmento de las mismas que retiene actividad antimicrobiana.

[0046] En otra forma de realización particular (viii), el péptido rico en cistina se selecciona de entre la plectasina, alfa defensina, HNP-1 (péptido neutrofílico humano), HNP-2, HNP-3; beta defensina-12 drosomicina, gamma-purotionina, defensina de insectos A y/o los péptidos antimicrobianos descritos en WO 03/044049; así como cualquier variante o fragmento de las mismas que retiene actividad antimicrobiana.

30 [0047] En otra forma de realización particular (ix), el péptido con una composición inusual se selecciona de entre indolicidina, el péptido rico en prolina/arginina PR39, bactenicina Bac5, bactericina Bac7, histatina 5; poli-L-lisina, y/o los péptidos antimicrobianos descritos en DK 2003 001324; así como cualquier variante o fragmento de las mismas que conserva actividad antimicrobiana.

35 [0048] En una forma de realización inmóvil más particular (x), el péptido con aminoácidos inusuales se selecciona de entre nisina, gramicidina A, y/o alameticina; así como cualquier variante o fragmento de la misma que conserve actividad antimicrobiana.

[0049] En una forma de realización particular adicional (xi), el péptido es un péptido antifúngico.

[0050] En una forma de realización todavía más particular (xii), el péptido expresado no contiene ninguna proteína de armazón de protección.

40 [0051] En una forma de realización particular (xiii), el péptido tiene actividad antimicrobiana y/o unos efectos inmunoestimuladores.

[0052] En una forma de realización todavía más particular (xiv), el péptido de beta lámina se selecciona de entre lactoferrinas, lactoferrinas (tal como lactoferrina B), tachiplesina I, y/o protegina PG1-5; así como de cualquier variante o fragmento de las mismas que conserve actividad antimicrobiana.

45 [0053] La lactoferrina es una glicoproteína implicada en la fijación y reparto del hierro en mamíferos, en los que se encuentra en la leche y otros líquidos del organismo. Ejemplos de lactoferrinas son la lactoferrina humana, lactoferrina bovina, lactoferrina porcina, lactoferrina equina, lactoferrina murina, lactoferrina caprina, etc. La lactoferrina fue descrita como un agente antimicrobiano hace más de 20 años.

50 [0054] El término lactoferrina como se utiliza en este caso designa fragmentos de lactoferrina con actividad antimicrobiana y/o un efecto inmunoestimulante. En una forma de realización particular, la lactoferrina para su uso según la invención se deriva de lactoferrina bovina (LFB), una proteína de 689 aminoácidos, que ha sido producida industrialmente a partir de suero de queso y complementado a los preparados para lactantes durante varios años.

[0055] Varios ejemplos de lactoferrinas para su uso según la invención se enumeran a continuación (una lista no exclusiva):

- SEC ID nº: 1-4 descritas en EP 474506 son péptidos antimicrobianos producidos mediante hidrólisis de lactoferrina;
- SEC ID nº: 5-19, al igual que sus derivados con una amida al final del carboxilo, descritas en EP 503939, son péptidos antimicrobianos basados en aminoácidos 18-28 de lactoferrina bovina (LFB(18-28));
- 5 SEC ID nº: 20-31, al igual que sus derivados con una amida al final del carboxilo, descritos en EP 510912, son péptidos antimicrobianos obtenibles mediante hidrólisis de lactoferrina bovina;
- SEC ID nº: 32 descrita en EP 629213 es otro derivado de la lactoferrina para la producción de un medicamento para promover la liberación de leucotrieno B4 de neutrófilos polimorfonucleares o histamina de mastocitos;
- 10 SEC ID nº: 1-4. SEC ID nº: 15, SEC ID NOs: 20-32, y SEC ID NOs: 33-46 descritas en la patente estadounidense nº. 5.656.591 son ejemplos adicionales de péptidos antimicrobianos basados en la lactoferrina.
- SEC ID nº: 47 es aminoácidos 1-50 de lactoferrina bovina (LFB(1-50), y lactoferricina B (abreviado LFCinB, o LFB(17- 41)) designa aminoácidos 17-41 de SEC ID nº: 47.
- 15 SEC ID nº: 48-52, es decir, LFB(14-31), LFB(17-31), LFB(18-31), LFB(19-31), y LFB(20-31), respectivamente, son fragmentos de lactoferrina adicionales descritos en J. Peptide Sci. 5: 32-45 (1999) por Rekdal et al, que también divulga las SEC ID nº: 53-55, es decir, variantes LFB(17-31)17K, LFB(17-31)20F, y LFB(17-31)17K+20F, respectivamente.
- [0056] Lactoferrinas adicionales, por ejemplo SEC ID NOs. 56-57, es decir, LFB(17-30), y LFB(19-37), respectivamente, son descritas por Groenink et al. en FEMS Microbiology Letters 179 (1999) 217-222.
- [0057] Según Vogel et al (Biochem. Cell. Biol. 80 (2002): 49-63), un fragmento de LFB debe contener los seis aminoácidos 20-25 de los mismos (LFB(20-25), SEC ID nº: 58) para retener cualquier nivel práctico de actividad antimicrobiana.
- [0058] Varias variantes de LFB(17-31) son descritas por Stroem et al en J. Péptido Res. 2000, 56, 265-274, es decir 17A, 18A, 19A, 20A, 21A, 22A, 23A, 24A, 25A, 26A, 27A, 28A, 29A, 30A, y 31 A.
- 25 [0059] Variantes adicionales de LFB(17-31) son descritas por Haug y Svendsen en J. Peptide Sci. 7: 190-196 (2001), es decir, 22F, 24F, y 22F+24F.
- [0060] En formas de realización particulares, el péptido antimicrobiano para su uso según la invención (a) comprende la SEC ID nº: 58; (b) comprende la SEC ID nº: 47, y/o un fragmento o variante de la mismas; (c) comprende cualquiera de las SEC ID NOs: 48-52, SEC ID NOs: 56-57, y/o un fragmento o variante de las mismas.
- 30
- Enzimas**
- [0061] Una enzima es un polipéptido con actividad enzimática. Otros productos de proteína de interés para los objetivos de la presente invención (coexpresión con agentes antimicrobianos) son las hormonas, factores de coagulación de sangre, inmunoglobulinas, al igual que fragmentos o variantes de los mismos.
- 35 [0062] Lo siguiente es una lista no limitativa de ejemplos de enzimas de interés particular: endoglucanasa, xilanas, fitasa, proteasa, galactanasa, mananasa, dextranasa y alfa-galactosidasa. Enzimas adicionales de relevancia particular son pectato liasa, alfa-amilasa y AMG. En una forma de realización particular, la enzima es una xilanas, una fitasa, una galactanasa, o una proteasa. En una forma de realización todavía más particular, la enzima es una fitasa, o una proteasa. En una forma de realización todavía más particular la enzima no es glutatona-S-transferasa.
- 40 En otra forma de realización particular la enzima no es beta-glucuronidasa.
- [0063] No hay limitaciones en el origen de la enzima. Así, el término incluye no sólo enzimas naturales o de tipo salvaje obtenidas a partir de microorganismos de cualquier género, sino también de análogos, mutantes, variantes, fragmentos etc. de los mismos, al igual que enzimas sintéticas, tales como enzimas redistribuidas, y enzimas de consenso, mientras muestren la actividad enzimática pertinente. Tales enzimas genéticamente creadas se pueden preparar como se conoce generalmente en la técnica, por ejemplo por mutagénesis dirigida, por reacción en cadena de polimerasa (PCR), o por mutagénesis aleatoria.
- 45 [0064] En una forma de realización particular, la enzima, y/o la secuencia de nucleótidos codificante, es una enzima y/ o secuencia de nucleótidos heteróloga, o exógena, respectivamente. Esto significa que es extraño a la célula huésped de expresión seleccionada o prevista. El término heterólogo excluye secuencias de ácidos nucleicos naturales o de cepa natural endógenas a la célula huésped en cuestión.
- 50 [0065] En una forma de realización específica, la enzima es una variante poco alergénica, diseñada para invocar una respuesta inmunológica reducida cuando se expone a animales, incluido el hombre. Se pueden preparar variantes poco alergénicas usando técnicas conocidas en la técnica.
- [0066] Las enzimas se pueden clasificar basándose en el manual de Nomenclatura de Enzimas del NC-IUBBM, 1992), ver también la página web de ENZYME en internet: <http://www.expasy.ch/enzyme/>. ENZYME es un depósito
- 55

de información relacionado con la nomenclatura de enzimas. Está principalmente basado en las recomendaciones del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUB-MB) y describe cada tipo de enzima caracterizada a la que se le ha dado un número EC (Enzyme Commission) (Bairoch un. The ENZYME database, 2000, Nucleic Acids Res. 28:304-305). Esta nomenclatura enzimática IUB-MB se basa en su especificidad de sustrato y ocasionalmente en su mecanismo molecular; tal clasificación no refleja las características estructurales de estas enzimas.

[0067] Para los objetivos presentes una xilanasa es una enzima clasificada como EC 3.2.1.8. La xilanasa se puede derivar de una xilanasa bacteriana, por ejemplo de una cepa de *Bacillus*, o puede ser una xilanasa fúngica incluyendo levadura y xilanasas fúngicas filamentosas. Las xilanasas fúngicas pueden, por ejemplo, derivar de una cepa de *Aspergillus*, *Humicola*, *Thermomyces*, o *Trichoderma*.

[0068] Para los objetivos presentes, el término endoglucanasa designa cualquier enzima que es clasificada o se puede clasificar como EC 3.2.1.4, EC 3.2.1.6, EC 3.2.1.73, o EC 3.2.1.39. En formas de realización particulares, la endoglucanasa es una enzima clasificada como EC 3.2.1.4 o EC 3.2.1.6. Las endoglucanasas se pueden derivar de varias cepas fúngicas bacterianas, por ejemplo de cepas de *Thermoascus*.

[0069] El término proteasa como se utiliza en este caso es una enzima que se puede clasificar en el grupo enzimático EC 3.4. Ejemplos de proteasas son la proteasa I o la proteasa II de *Aspergillus acuelatus*; proteinasa ácida de *Aspergillus niger* (proteasa A)); aspergilopepsina O de *Aspergillus oryzae*; las proteasas de subtilisina de ácido estable descritas en la pág. 5, líneas 19-23 de WO 01/58275 derivadas de especies de *Bacillus*, *Bacillus alcalophilus*; *Fusarium oxysporum*; *Paecilomyces lilacinus*, especies de *Aspergillus*, *Acremonium chrisogenum*, y *Acremonium kiliense*; y las proteasas de ácido estable descritas en WO 01/58276 en la pág. 4, línea 27-28 derivada de especies de *Nocardioopsis* y *Nocardioopsis alba*.

[0070] La proteasa de especies de *Nocardioopsis* comprende la secuencia de aminoácidos de la parte madura (aminoácidos 1-188) de SEC ID n°: 59. Una proteasa preferida es A87T de la SEC ID n°: 59, es decir, una variante de la proteasa con aminoácidos 1-188 de la SEC ID n°: 59 donde Ala en la posición 87 se sustituye por Thr.

[0071] Otras proteasas preferidas son las siguientes:

La proteasa derivada a partir de *Nocardioopsis dassonvillei* subesp. *dassonvillei* y comprendiendo la secuencia de aminoácidos de la parte madura (aminoácidos 1-188) de la SEC ID n°: 60.

[0072] La proteasa derivada de *Nocardioopsis alba* y comprendiendo la secuencia de aminoácidos de la parte madura (aminoácidos 1-188) de la SEC ID n°: 61.

[0073] La proteasa derivada de *Nocardioopsis prasina* y comprendiendo la secuencia de aminoácidos de la parte madura (aminoácidos 1-188) de la SEC ID n°: 62.

[0074] Una proteasa derivada de *Nocardioopsis prasina* y comprendiendo la secuencia de aminoácidos de la parte madura (aminoácidos 1-188) de la SEC ID n°: 63.

[0075] En una forma de realización particular, las proteasas de las SEC ID n°: 59, 60, 61, 62 o 63 son variantes comprendiendo una extensión, tal como una extensión N-terminal o C-terminal, preferiblemente una extensión C-terminal. La extensión puede comprender al menos tres aminoácidos sin carga polar o no polares en los últimos cuatro aminoácidos del extremo C-terminal del polipéptido, en particular estas variantes tienen una extensión de uno o más aminoácido(s) añadidos al extremo C-terminal en comparación con las cepas naturales. En formas de realización más particulares:

- i) el aminoácido(s) añadido(s) es (son) no polares o sin carga;
- ii) el aminoácido(s) añadido(s) es (son) uno o más de Q, S, V, A o P;
- iii) el aminoácido(s) añadido(s) se selecciona del grupo que consiste en: QSHVQSAP (SEC ID n°: 84), QSAP (SEC ID n°: 85), QP, TL, TT, QL, TP, LP, TI, IQ, QP, PI, LT, TQ, QQ, y PQ.

[0076] En una forma de realización más, la proteasa tiene un grado de identidad de aminoácidos 1-188 de la SEC ID n°: 59 de al menos el 70%, preferiblemente al menos el 75%, 80%, 85%, 90%, o al menos el 95%.

[0077] Para los objetivos de la presente invención el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina mediante el programa "align" que es un alineamiento Needleman-Wunsch (es decir, un alineamiento global) La matriz de puntuación por defecto BLOSUM50 se usa para alineamientos de polipéptidos. La penalización para el primer residuo de un *gap* es -12 para polipéptidos, y la penalización para más residuos de un *gap* es -2 para polipéptidos.

[0078] "Align" es parte de la versión v20u6 del paquete FASTA (ver 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) Los alineamientos de proteína de FASTA usan el algoritmo Smith-Waterman sin limitación en el tamaño del *gap* (ver "Smith-Waterman algorithm", T.F. Smith y M. S. Waterman (1981) J. Wol. Biol. 147:195-197).

[0079] En el presente contexto una fitasa es una enzima que se puede clasificar como EC 3.1.3.8, y/o EC 3.1.3.26. Las fitasas se pueden obtener de, por ejemplo, varias cepas de *Aspergillus* y *Emericella*, *Thermomyces*, *Humicola*, *Peniophora*, *Penicillium*, *Bacillus*, *Escherichia coli*; o *Schwanniomyces*.

5 [0080] Una fitasa preferida deriva de *Peniophora licii* y comprende los aminoácidos 1-409 de la SEC ID n°: 64, o es una variante de la misma. En una forma de realización particular, la variante se selecciona a partir de las variantes descritas en las tablas 1-5 de WO 03/066847.

[0081] En una forma de realización todavía más particular, la fitasa tiene un grado de identidad a los aminoácidos 31-439 de la SEC ID n°: 64 de al menos el 75%.

10 [0082] El término galactanasa como se utiliza en este caso es una enzima que se puede clasificar como EC 3.2.1.89. Las galactanasas pueden ser derivadas de, por ejemplo, cepas de *Aspergillus*, *Bacillus*, *Thermotoga*, *Meripilus*, *Myceliophthora*, *Humicola*, *Pseudomonas*, *Xantomonas*, o *Yersinia*.

[0083] El término mananasa como se utiliza en este caso significa una enzima que se puede clasificar como EC 3.2.1.78. La mananasa se puede, por ejemplo, derivar de cepas de *Aspergillus*, *Bacillus*, o *Trichoderma*.

15 [0084] El término dextranasa como se utiliza en este caso significa una enzima que se puede clasificar como EC 3.2.1.11. La dextranasa puede, por ejemplo, derivar de una cepa de *Paecilomyces*.

[0085] El término alfa-galactosidasa como se utiliza en este caso significa una enzima que se puede clasificar como EC 3.2.1.22. La alfa-galactosidasa puede, por ejemplo, derivar de una cepa de *Aspergillus*.

[0086] El término alfa-amilasa como se utiliza en este caso es una enzima que se puede clasificar como EC 3.2.1.1.

[0087] El término glucoamilasa como se utiliza en este caso es una enzima que se puede clasificar como EC 3.2.1.3.

20 [0088] El término pectato liasa como se utiliza en este caso es una enzima que se puede clasificar como EC 4.2.2.2.

[0089] Cepas de las especies mencionadas arriba y otras cepas mencionadas aquí son fácilmente accesibles al público en una serie de colecciones de cultivo, tales como la American Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS), y Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center, (NRRL).

25 **Secuencias de ácidos nucleicos**

[0090] Las secuencias de ácidos nucleicos para su uso en la presente invención pueden ser de origen genómico, ADNc, ARN, semisintético o sintético, o cualquier combinación de los mismos.

30 [0091] Las técnicas usadas para aislar o clonar una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un agente antimicrobiano o una enzima se conocen en la técnica e incluyen aislamiento de ADN genómico, preparación de ADNc, síntesis química, o una combinación de las mismas. La mayor parte de los genes peptídicos son sintetizados químicamente. Los genes peptídicos encontrados mediante sistema de purga (p. ej. TAST, es decir, Transposon Assisted Signal Trapping) son de origen natural.

35 [0092] La clonación de las secuencias de ácidos nucleicos de tal ADN genómico se puede realizar por ejemplo, usando la conocida reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la selección de anticuerpos de bancos de expresión para detectar fragmentos de ADN clonados con características estructurales compartidas. Ver, por ejemplo, Innis et al., 1990, PCR: A Guide to Methods and Application, Academic Press, Nueva York. Otros procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos tales como la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la transcripción activada ligada (LAT) y la ampliación basada en secuencia de ácidos nucleicos (NASBA) se pueden utilizar.

40 [0093] La secuencia de ácidos nucleicos que codifica la enzima y/o el agente antimicrobiano puede, por ejemplo, ser clonada a partir de una cepa de la bacteria u hongo deseado, u otro organismo relacionado y así, por ejemplo, puede ser un variante alélica o de la especie.

45 [0094] El término "secuencia de ácidos nucleicos aislada" como se utiliza en este caso se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que está esencialmente libre de otra secuencias de ácidos nucleicos, por ejemplo, al menos aproximadamente 20% pura, preferiblemente al menos aproximadamente 40% pura, más preferiblemente al menos aproximadamente 60% pura incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 80% pura, y de la forma más preferible al menos aproximadamente 90% pura según lo determinado por la electroforesis de agarosa. Por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos aislada se puede obtener mediante procedimientos de clonación estándar usados en la ingeniería genética para recolocar la secuencia de ácidos nucleicos de su ubicación natural a un sitio diferente donde ésta será reproducido. Los procedimientos de clonación pueden implicar escisión y aislamiento de un fragmento de ácido nucleico deseado comprendiendo la secuencia de ácido nucleico que codifica el agente antimicrobiano o la enzima, inserción del fragmento en una molécula de vector, e incorporación del vector recombinante en una célula huésped donde se replicarán las copias múltiples o clones de la secuencia de ácidos nucleicos.

55

[0095] La modificación de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un agente antimicrobiano o una enzima tal y como se define en la reivindicación 1 puede ser necesaria para la síntesis de agentes variantes o enzimas variantes. Los términos "agente variante" y "enzima variante" se refieren a formas no naturales de las mismas. Estas pueden diferir en alguna forma creada genéticamente del agente antimicrobiano o enzima como aislada de su fuente nativa, por ejemplo, variantes de agentes y enzimas que difieren en su actividad específica, termoestabilidad, PH óptimo, potencial alergénico, o agentes variantes que difieren en su actividad antimicrobiana o perfil de especificidad, o similares. La secuencia variante se puede construir basándose en las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el agente o la parte madura de la enzima, por ejemplo, una subsecuencia de la misma, y/o mediante la introducción de sustituciones de nucleótido que no dan lugar a otra secuencia de aminoácidos del polipéptido codificada por la secuencia de ácido nucleico, pero que corresponden al uso del codón del organismo huésped destinado para la producción de la enzima y el agente, o por introducción de sustituciones de nucleótido que pueden dar lugar a una secuencia de aminoácidos diferente. Para una descripción general de sustitución del nucleótido, ver, por ejemplo, Ford et al., 1991, Protein Expression and Purification 2: 95-107. Enzimas poco alergénicas y agentes antimicrobianos pueden por ejemplo prepararse como se ha descrito anteriormente.

[0096] Será evidente para los expertos en la técnica que tales sustituciones se pueden hacer fuera de las regiones críticas para la función de la molécula y todavía dar como resultado un agente o enzima activa. Residuos de aminoácidos esenciales para la actividad de la enzima o agente antimicrobiano codificado por la secuencia de ácidos nucleicos, y por lo tanto preferiblemente no sujetos a sustitución, se pueden identificar con procedimientos conocidos en la técnica, tales como la mutagénesis dirigida o la mutagénesis de escaneado de alanina (ver, por ejemplo, Cunningham y Wells, 1989, Science 244: 1081-1085). En esta última técnica, se introducen mutaciones en cada residuo cargado positivamente en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se evalúan para la actividad de identificar residuos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula. Sitios de interacción sustrato-enzima pueden también determinarse mediante análisis de la estructura tridimensional como se determina por tales técnicas como análisis de resonancia magnética nuclear, cristalografía o etiquetado de fotoafinidad (ver, por ejemplo, de Vos et al., 1992, Science 255: 306-312; Smith et al., 1992, Journal of Molecular Biology 224: 899-904; Wlodaven et al., 1992, FEBS Letters 309: 59-64).

Constructos de ácidos nucleicos

[0097] La presente invención se refiere a constructos de ácidos nucleicos de un cierto tipo, es decir, constructos que comprenden una primera secuencia de ácidos nucleicos que codifica un agente antimicrobiano, y una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica una enzima, operativamente conectada a una o más secuencias de control que dirigen la expresión de estas secuencias de codificación en una célula huésped adecuada bajo condiciones compatibles con las secuencias de control. En una forma de realización particular, la segunda secuencia de ácido nucleicos es heteróloga al huésped de expresión.

[0098] "Constructo de ácidos nucleicos" se define aquí como una molécula de ácido nucleico, mono o bicatenaria, que se aísla de un gen de origen natural o que ha sido modificada para contener segmentos de ácidos nucleicos combinados y superpuestos de una manera que, de lo contrario, no existirían en la naturaleza. El término constructo de ácidos nucleicos es sinónimo del término casete de expresión cuando el constructo de ácidos nucleicos contiene todas las secuencias de control requeridas para la expresión.

[0099] El término "secuencia codificante de ácidos nucleicos" o "secuencia codificante" se define aquí como una secuencia de ácidos nucleicos que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de su péptido o producto enzimático. Los bordes de la secuencia codificante se determinan generalmente por un sitio de unión a ribosomas (procariotas) o por el codón de inicio ATG (eucariotas) localizados justo encima del marco de lectura abierto en el extremo 5' del ARNm y una secuencia del terminador de transcripción localizada justo debajo del marco de lectura abierto en el extremo 3' del ARNm. Una secuencia codificante puede incluir, pero no se limita a ADN, ADNc, y secuencias de ácidos nucleicos recombinantes.

[0100] La expresión se entiende que incluye cualquier paso implicado en la producción de la enzima y el agente antimicrobiano incluyendo, pero no sin limitarse a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional, y secreción.

[0101] El término "secuencias de control" se define aquí para incluir todos los componentes que son necesarios o ventajosos para la expresión de una enzima, y un agente antimicrobiano, respectivamente. Cada secuencia de control puede ser nativa o extranjera a la secuencia de ácidos nucleicos de codificación respectiva. Tales secuencias de control incluyen, pero de forma no limitada, un líder, secuencia de poliadenilación, secuencia de propéptido, promotor, secuencia de péptido señal, y terminador de transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor y señales de parada de traducción y transcripción. Las secuencias de control pueden estar provistas de conectores con el fin de introducir sitios de restricción específicos para facilitar la unión de las secuencias de control con la región de codificación de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido. El término "conectado operativamente" se define aquí como una configuración en la que una secuencia de control se coloca apropiadamente en una posición relativa a la secuencia codificante de la secuencia de ADN de manera que la secuencia de control dirige la expresión de un polipéptido.

[0102] La secuencia de control puede ser una secuencia de promotor apropiada, una secuencia de ácidos nucleicos que es reconocida por una célula huésped para la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos. La secuencia de

promotor contiene secuencias de control transcripcionales que median la expresión del polipéptido. El promotor puede ser cualquier secuencia de ácidos nucleicos que muestra actividad transcripcional en la célula huésped de elección incluyendo promotores mutantes, truncados e híbridos, y se pueden obtener a partir de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares bien homólogos o heterólogos a la célula huésped.

5 [0103] 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 del operón lac de *E. coli*, gen de agarasa de *Streptomyces coelicolor* (dagA), gen de levansucrasa de *Bacillus subtilis* (sacB), gen de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (amyL), gen de amilasa maltogénica *Bacillus stearothermophilus* (amyM),
10 gen de alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (amyQ), gen de penicilinas de *Bacillus licheniformis* (penP), genes xylA y xylB de *Bacillus subtilis* y gen de beta-lactamasa procariota (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences EEUU 75: 3727-3731), al igual que el promotor tac (DeBoer et al., 1983, Proceedings of the National Academy of Sciences 80: 21-25). Más promotores se describen en "Useful proteins from recombinant bacteria" en Scientific American, 1980, 242: 74-94; y en Sambrook et al., 1989, supra.

15 [0104] 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 *Aspergillus oryzae* amilasa TAKA, proteinasa aspártica de *Rhizomucor mihei*, alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, alfa-amilasa de ácido estable de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de awamori de *Aspergillus niger* o *Aspergillus* (glaA), lipasa de *Rhizomucor mihei*, 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
20 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 un promotor mutante, truncado e híbrido de los mismos.

[0105] En un huésped de levadura, se obtienen promotores útiles a partir de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), galactocinasa de *Saccharomyces cerevisiae* (GAL1), alcohol de deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH2/GAP), y fosfoglicerato-quinasa 3 de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros promotores útiles para células huéspedes de levadura son descritos por Romanos et al., 1992, Yeast 8: 423-488.

[0106] La secuencia de control puede también ser una secuencia del terminador de transcripción adecuada, una secuencia reconocida por una célula huésped para terminar la transcripción. La secuencia del terminador está conectada operativamente al extremo terminal 3' de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido.
30 Cualquier terminador que es funcional en la célula huésped de elección se puede utilizar en la presente invención.

[0107] Terminadores preferidos para células huéspedes filamentosas fúngicas se obtienen a partir de los genes para amilasa TAKA de *Aspergillus oryzae*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, sintasa de antranilato de *Aspergillus nidulans*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger* y proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.

35 [0108] Terminadores preferidos para células huéspedes de levadura se obtienen 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 levadura son descritos por Romanos et al., 1992, supra.

[0109] Terminadores preferidos para células huéspedes bacterianas, tales como una célula huésped de *Bacillus*, son los terminadores del gen de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (amyL), el gen de amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus* (amyM) o el gen de alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (amyQ).

[0110] La secuencia de control puede también ser una secuencia guía adecuada, una región no traducida de un ARNm que es importante para la traducción mediante la célula huésped. La secuencia guía está enlazada operativamente al extremo terminal 5' de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido. Cualquier secuencia guía que es funcional en la célula huésped de elección se puede utilizar en la presente invención.

45 [0111] Líderes preferidos para células huéspedes filamentosas fúngicas se obtienen de los genes para amilasa TAKA de *Aspergillus oryzae* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

[0112] Líderes adecuados para células huéspedes de levadura se obtienen de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), fosfoglicerato-quinasa-3 de *Saccharomyces cerevisiae*, alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae* y dehidrogenasa de dehidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato de alcohol de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH2/GAP).
50

[0113] La secuencia de control puede también ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia operativamente conectada al extremo terminal 3' de la secuencia de ácidos nucleicos y que, al transcribirlo, es reconocido 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 se puede utilizar en la presente invención.

55 [0114] Secuencias de poliadenilación preferidas para células huéspedes filamentosas fúngicas se obtienen de los genes para amilasa TAKA de *Aspergillus oryzae*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, sintasa de antranilato de *Aspergillus nidulans*, proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*, y alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*.

[0115] Secuencias de poliadenilación útiles para células huéspedes de levadura son descritas por Guo y Sherman, 1995, *Molecular Cellular Biology* 15: 5983-5990.

[0116] La secuencia de control puede también ser una región de codificación de péptido señal que codifica para una secuencia de aminoácidos enlazada al amino-terminal de una enzima y dirige la enzima codificada en la vía secretora de la célula. El final 5' de la secuencia codificante de la secuencia de ácidos nucleicos puede contener intrínsecamente una región de codificación de péptido señal naturalmente enlazado en el marco de lectura de traducción con el segmento de la región de codificación que codifica la enzima segregada. Alternativamente, el extremo 5' de la secuencia codificante puede contener una región de codificación de péptido señal que es externo a la secuencia codificante. La región de codificación del péptido señal externo puede ser requerido cuando la secuencia codificante no contenga de manera natural una región de codificación de péptido señal. Alternativamente, la región de codificación de péptido señal externo puede simplemente reemplazar la región de codificación de péptido señal natural para mejorar la secreción de la enzima. No obstante, cualquier región de codificación de péptido señal que dirige la enzima expresada en la vía secretora de una célula huésped de elección se puede utilizar en la presente invención.

[0117] Regiones de codificación de péptido señal eficaces para células huéspedes bacterianas son las regiones de codificación de péptido señal obtenidas a partir de los genes para amilasa maltogénica de *Bacillus* NCIB 11837, alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, subtilisina de *Bacillus licheniformis*, beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis*, proteasas neutras de *Bacillus stearothermophilus* (nprT, nprS, nprM), y *Bacillus subtilis* prsA. Otros péptidos señal son descritos por Simonen y Palva, 1993, *Microbiological Reviews* 57: 109-137.

[0118] Regiones de codificación de péptido señal eficaces para células huéspedes filamentosas fúngicas son las regiones de codificación de péptido señal obtenidas a partir de los genes para amilasa TAKA de *Aspergillus oryzae*, amilasa neutra de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor mihei*, celulasa de *Humicola insolens*, y lipasa de *Humicola lanuginosa*.

[0119] Péptidos señal útiles para células huéspedes de levadura se obtienen a partir de los genes para factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* e invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otras regiones de codificación de péptido señal útiles son descritas por Romanos et al., 1992, supra.

[0120] La secuencia de control puede también ser una región de codificación de propéptido que codifica para una secuencia de aminoácidos situada en el amino-terminal de una enzima. La enzima resultante es conocida como una proenzima o propolipéptido (o un zimógeno en algunos casos). Una proenzima es generalmente inactiva y se puede convertir en una enzima madura activa mediante escisión autocatalítica o catalítica del propéptido del propolipéptido. La región de codificación de propéptido se puede obtener de los genes para proteasa alcalina de *Bacillus subtilis* (aprE), proteasa neutra de *Bacillus subtilis* (nprT), factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor mihei*, y lacasa de *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836).

[0121] Cuando tanto la región de péptido señal como la de propéptido están presentes en el amino-terminal de una enzima, la región de propéptido está situada junto al amino-terminal de una enzima y la región de péptido señal está situada junto al amino-terminal de la región de propéptido.

[0122] También puede ser deseable añadir secuencias reguladoras que permitan la regulación de la expresión del polipéptido en relación al crecimiento de la célula huésped. Ejemplos de sistemas reguladores son los que causan que la expresión del gen se active o desactive en respuesta a un estímulo físico o químico, incluyendo la presencia de un compuesto regulador. Sistemas reguladores en sistemas procarióticos incluyen los sistemas operadores tac, tac y trp. En levadura, se puede utilizar el sistema ADH2 o el sistema GAL1. En hongos filamentosos, el promotor de alfa-amilasa TAKA, el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger*, y el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae* se pueden utilizar como secuencias reguladoras. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son los que permiten la amplificación genética. En sistemas eucarióticos, estos incluyen el gen de dihidrofolato-reductasa que se amplifica en presencia de metotrexato, y los genes de metalotioneína que se amplifican con metales pesados. En estos casos, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la enzima estaría operativamente conectada con la secuencia reguladora.

[0123] El constructo de ácidos nucleicos de la invención puede comprender más de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica más de una enzima, p. ej. una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho nueve o diez secuencias de ácidos nucleicos que codifican una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho nueve o diez enzimas. Las enzimas pueden ser iguales o diferentes. Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican la(s) enzima(s) pueden ser iguales o diferentes.

[0124] El constructo de ácidos nucleicos de la invención puede también comprender más de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica más de un agente antimicrobiano, p. ej. una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve o veinte secuencias de ácidos nucleicos que codifican uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve o veinte agentes antimicrobianos. El constructo de ácidos nucleicos de la invención puede también comprender más de veinte secuencias de ácidos nucleicos que codifican más de veinte agentes antimicrobianos, p. ej. hasta veinticinco, treinta, treinta y cinco, cuarenta, cuarenta y cinco, o hasta cincuenta secuencias de ácidos nucleicos que codifican hasta veinticinco, treinta, treinta y cinco, cuarenta,

cuarenta y cinco, o hasta cincuenta agentes microbianos. Los agentes antimicrobianos pueden ser iguales o diferentes. Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el(los) agente(s) antimicrobiano(s) puede(n) ser iguales o diferentes. El número de secuencias de ácidos nucleicos puede, en particular, estar en el intervalo más alto cuando la expresión se desarrolla en cuerpos de inclusión.

5 [0125] En el constructo de ácidos nucleicos de la invención, la(s) secuencia(s) de ácidos nucleicos que codifica(n) la(s) enzima(s) puede(n) estar en la parte de arriba de la(s) secuencia(s) de ácidos nucleicos que codifica(n) el(los) agente(s) antimicrobiano(s), o viceversa. Aún más, algunas de las secuencias de codificación enzimática pueden estar arriba, algunas abajo, de las secuencias de codificación de agentes antimicrobianos, y viceversa.

10 [0126] Por supuesto, como es bien sabido, en todos los constructos de ácidos nucleicos descritos aquí las secuencias de componente individual, tales como las secuencias de ácidos nucleicos que codifican la(s) enzima(s), el(los) agente(s) antimicrobiano(s), las secuencias de control, y también los enlaces y dominios descritos a continuación, deberían estar distanciados y superpuestos adecuadamente para permitir que ocurra la expresión deseada y correcta.

15 [0127] Tres ejemplos a)-c) de constructos de ácidos nucleicos relativamente simples de la invención se enumeran a continuación. Los constructos se enumeran en la dirección usual de 5' a 3', y se utilizan las siguientes abreviaciones: AMP: Péptido Antimicrobiano; ENZ: Enzima; RBS: sitio de unión al ribosoma, PROM: promotor; TERM: terminador):

a) PROM-RBS1-Gen(AMP)-Conector-Gen(ENZ)-TERM

b) PROM-RBS1-Gen(AMP)-RBS2-Gen(ENZ)-TERM

c) PROM1-RBS1-Gen(AMP)-TERM1-PROM2-RBS2-Gen(Enzima)-TERM2

20 [0128] Ejemplo a): este constructo resulta en un producto transcripcional, y un producto traduccional, es decir, una proteína de fusión (producto de fusión). En los constructos anteriores, "Conector" designa un conector escindible, que se describe más minuciosamente a continuación, y que proporciona para una escisión posterior de la proteína de fusión, AMP-Conector-ENZ, en productos diferentes, AMP, y ENZ, respectivamente.

25 [0129] Ejemplo b): este constructo resulta en un producto transcripcional, pero dos productos traducionales, ya que la traducción parará debido al codón de terminación traduccional inherente en el Gen(AMP). Por consiguiente, dos productos diferentes, AMP y ENZ, serán producidos.

30 [0130] Ejemplo c): en este constructo, la transcripción parará después del Gen(AMP), pero la transcripción continúa en PROM2. Por consiguiente, dos productos de transcripción, al igual que dos productos traducionales, AMP y ENZ, resultan de este constructo. Mediante la aplicación de los promotores PROM1 y PROM2 de resistencia variable, o usando uno o más promotores inducibles, la expresión de AMP se puede regular en comparación con ENZ, o viceversa, p. ej con el propósito de obtener proporciones molares deseadas de expresión de AMP contra ENZ.

35 [0131] Los constructos d)-f) a continuación son ejemplos no limitativos de constructos de ácidos nucleicos de la invención incorporando más de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la enzima y/o el péptido. La misma anotación anterior se aplica, las secuencias de control, conectores, etc. son no obstante excluidas por simplicidad:

d) Gen(ENZ)-Gen(AMP)-Gen(AMP)

e) Gen(ENZ)-Gen(AMP)-Gen(AMP)-Gen(AMP)

f) Gen(ENZ)-Gen(AMP)-Gen(AMP)-Gen(AMP)-Gen(ENZ)

40 [0132] En los constructos anteriores, AMP puede designar la misma o diferentes secuencias AMP, y lo mismo ocurre con ENZ.

Conectores escindibles

45 [0133] Al nivel de aminoácidos, el término "conector escindible" se define aquí como una secuencia de aminoácidos, típicamente relativamente corta, que, por ejemplo, consta de 1-30 aminoácidos que comprenden un sitio de escisión. El término "sitio de escisión" hace referencia a una secuencia específica de aminoácidos, típicamente muy corta, que, por ejemplo, consta de 1-10 aminoácidos que se puede escindir específicamente por un agente de escisión, es decir, por medios químicos o físicos, típicamente enzimáticos. Ejemplos no limitativos de conectores divisibles, sitios de reconocimiento y escisión, y agentes de escisión se enumeran a continuación.

50 [0134] Por ejemplo, el conector escindible puede ser un sitio de reconocimiento para una proteasa específica de sitio. Un ejemplo de una proteasa específica de sitio (agente de escisión) es la proteinasa ligada a la membrana Kex2 de células alfa de la levadura de *Saccharomyces cerevisiae*. La proteinasa Kex2 hidroliza péptidos y proteínas con pares de aminoácidos básicos que se escinden en los extremos C de sus enlaces peptídicos (Bessmertnaya et al. (1997) *Biochemistry*, Vol. 62 (8) págs. 850-857. Ejemplos de los sitios de escisión Kex2 son Lys-Arg (K-R) y Arg-Arg (R-R), y también otras combinaciones de aminoácidos básicos se podrían insertar para optimizar la escisión por Kex2 (Ledgerwood. et al. (1995) *J.Biochem.*, Vol. 308 (1) págs. 321-325; o Ghosh, S. et al. (1996) *Gene* (Amsterdam) Vol. 176 (1-2) págs. 249-255).

[0135] Otras combinaciones útiles de proteasas (agentes de escisión) y conectores de escisión son: Enteroquinasa (La Vallie et al. (1993) J.Biol.Chem., Vol 268 pp.2311-2317) con una preferencia para escindir la secuencia de aminoácidos X-D-D-K-/X (SEC ID n°: 86), tripsina (Jonasson et al. (1996) Eur.J.Biochem., Vol 236 (2) págs. 656-661) con una preferencia para escindir la secuencia de aminoácidos X-K-R-/X (SEC ID n°: 87), Factor Xa (Nagai et al. (1985) PNAS, Vol 82 págs. 7252-7255) con una preferencia para escindir la secuencia de aminoácidos X-I-E-G-R-/X (SEC ID n°: 88), colagenasa (Chinery et al. (1993) Eur.J.Biochem., Vol 212 (2) págs. 557-553) con una preferencia para escindir la secuencia de aminoácidos P-X-/G-P-X-X (SEC ID n°: 89), trombina (Rahman et al. (1992) Cell.Mol.Biol., Vol 38 (5) págs. 529-542) con una preferencia para la escisión de la secuencia de aminoácidos X-G-V-R-G-P-R-/X (SEC ID n°: 90), ALP (proteasa específica Lys de *Achromobacter lyticus*) (Kjeldsen et al., (1996) Gene, Vol 170 (1) págs. 107-112) con una preferencia para escindir la lisina, y la proteasa componente C de *Bacillus licheniformis* escindiéndose en Glu (Kakudo et al. (1992) J.Biol.Chem., Vol 267 (33) págs. 23782-23788). Las proteasas digestivas son proteasas útiles adicionales, en particular la tripsina (mencionada anteriormente), pero también la pepsina, quimiotripsina, y proteasa del páncreas. La quimiotripsina puede tener una preferencia para escindir después aminoácidos aromáticos y Leu.

[0136] Otro método preferido de escisión de un péptido en un sitio de objetivo específico es usar compuestos químicos tales como bromuro cianógeno que escinde X-M-/X o hidroxilamina que escinde S-N-/G-X (SEC ID n°: 91) (Current protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, 1995; Harwood, C. R., and Cutting, S. M.(eds.)).

[0137] Un método de escisión inmóvil más específico está disponible para enlaces peptídicos D-/P (Asp-Pro), que se pueden escindir mediante tratamiento con un ácido débil (p. ej. pH 2-3) a una temperatura adecuada, durante un período de tiempo adecuado. Ejemplos de temperaturas adecuadas son 40, 50, 60, 70, o 80°C, y ejemplos de períodos de tiempo adecuados son de unos minutos a unas pocas horas, por ejemplo de ¼ hora a 5 horas, de ½ hora a 2½ horas, de 1 hora a 3 horas, de 1½ horas a 2½ horas.

[0138] A nivel de nucleótido, las secuencias de nucleótidos correspondientes a los enlaces de escisión anteriores, al igual que a los dominios de protección peptídica abajo, son evidentemente fácilmente deducidas por el experto en la técnica mediante referencia al código genético. Las secuencias de nucleótidos pueden también ser optimizadas para el uso del codón de la célula huésped en cuestión, como es bien sabido en la técnica.

Péptidos de protección

[0139] La presente invención también se refiere al uso, en la expresión recombinante de péptidos antimicrobianos, de un, así llamado, dominio de extinción, o péptido de protección, o dominio de protección, que se caracteriza por el hecho de que al menos el 50% de sus residuos de aminoácidos componentes son E y/o D. El propósito de tal dominio de protección es inactivar temporalmente el péptido antimicrobiano, en este caso se trataría de inhibir el crecimiento de la célula huésped. Una vez que se han producido cantidades suficientes del péptido, el péptido de protección se puede escindir como se describe más abajo, reactivando así el péptido antimicrobiano. El péptido de protección es preferiblemente sintético (artificial).

[0140] En formas de realización particulares, al menos el 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o al menos el 99% de los residuos de aminoácidos comprendidos en el péptido de protección son D y/o E. En una forma de realización particular adicional, la secuencia de aminoácidos completa del péptido de protección consiste en los residuos de aminoácidos D y/o E. En una forma de realización todavía más particular, el péptido de protección consiste en al menos uno de los residuos de aminoácidos D y/o E, y, opcionalmente, un conector de escisión.

[0141] En formas de realización particulares o alternativas de este aspecto de la invención: (1) el número de residuos de aminoácidos D y/o E en el péptido de protección es superior al número de residuos de R y/o K; (2) el péptido de protección no contiene ningún residuo C; (3) el número de residuos de aminoácidos en el péptido de protección es inferior al número de residuos de aminoácidos en el péptido antimicrobiano; y/o (4) el péptido de protección no es un inhibidor de proteasas bacterianas.

[0142] En una forma de realización particular, el péptido de protección designa aquella parte del producto de fusión expresado que no es el agente antimicrobiano, y que no es la parte del péptido señal, si la hay. En otras formas de realización particulares, el péptido de protección es una extensión de aminoácidos cerca del péptido antimicrobiano. La longitud del péptido de protección se describe con más detalle a continuación. El péptido de protección y el péptido antimicrobiano pueden estar separados por una extensión de aminoácidos de hasta 5, hasta 8, hasta 10, hasta 12, hasta 15, hasta 20, hasta 25, o hasta 30 aminoácidos.

[0143] La secuencia de ácidos nucleicos que codifica el dominio de protección peptídica puede estar por encima o por debajo de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el péptido antimicrobiano. En otros aspectos, la invención se refiere a un constructo de ácidos nucleicos que comprende una primera secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido antimicrobiano, y una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica un dominio de protección peptídica tal como se ha definido anteriormente; al igual que una célula huésped recombinante que comprende tal constructo; y un método para la producción del péptido antimicrobiano mediante cultivo de la célula huésped recombinante, y recuperación de los péptidos, el método comprendiendo opcionalmente el paso de escindir el dominio de protección peptídica usando un agente de escisión apropiado, ejemplos de los cuales se han mencionado anteriormente.

[0144] En formas de realización particulares de estos aspectos de extinción de la invención, todo lo que se declara aquí en relación a los aspectos de coexpresión de la invención también se aplica al aspecto de extinción. Esto es así en particular, por ejemplo, en relación al péptido antimicrobiano, las secuencias de control, las células huéspedes etc. Asimismo, todo lo que se declara aquí en relación a los aspectos de extinción es aplicable a los aspectos de coexpresión de la invención.

[0145] El péptido de protección es típicamente un oligopéptido o un péptido que comprende un número de aminoácidos modificados, naturales o no naturales que se conectan mediante enlaces peptídicos. En una forma de realización particular los aminoácidos constituyentes son L-aminoácidos naturales.

[0146] Típicamente, el péptido de protección abarca, en la forma alternativa consiste en, entre 1 y 100, 1 y 95, 1 y 90, 1 y 85, 1 y 80, 1 y 75, 1 y 70, 1 y 65, 1 y 60, 1 y 55, 1 y 50, 1 y 45, 1 y 40, 1 y 35, 1 y 30, 1 y 25, 1 y 20, 1 y 15, o entre 1 y 10 residuos de aminoácidos.

[0147] En formas de realización más particulares, el péptido de protección engloba, en la forma alternativa consiste en, entre 1 y 100, 2 y 100, 3 y 100, 4 y 100, 5 y 100, 6 y 100, 7 y 100, 8 y 100, 9 y 100, o 10 y 100 residuos de aminoácidos.

[0148] En formas de realización adicionales particulares, el péptido de protección engloba, en la forma alternativa consiste en, entre 1 y 100, 2 y 90, 3 y 80, 4 y 70, 5 y 60, 5 y 50, 5 y 40, 5 y 35, 5 y 30, 5 y 25, o entre 5 y 20 residuos de aminoácidos.

[0149] Estos son ejemplos no limitativos de péptidos de protección de la invención (en la dirección convencional, N-terminal primero): E, D, ED, DE, DDE, EED, DED, EDE, DDEEE (SEC ID n°: 92), DDDEE (SEC ID n°: 93), DDDDE (SEC ID n°: 94), EEDDE (SEC ID n°: 95), DDEED (SEC ID n°: 96), EDEDE (SEC ID n°: 97), DDDEEE (SEC ID n°: 98), DEDEDE (SEC ID n°: 99), y EEDDEE (SEC ID n°: 100).

[0150] En una forma de realización particular, el péptido de protección se selecciona de entre los siguientes: DP, DDDDDP (SEC ID n°: 101), EEEEEEDP (SEC ID n°: 102), E, DE, DDE, DDDE (SEC ID n°: 103), DDDDE (SEC ID n°: 94), DEDEDEDP (SEC ID n°: 104), DDDGGEEEGGDDDP (SEC ID n°: 105), y DDDGGDDPPDDDE (SEC ID n°: 106).

[0151] Aquellos de los péptidos de protección anteriores que contienen E son de paso enlaces también divisibles per se, porque por ejemplo, la proteasa componente-C de *Bacillus licheniformis* se dividirá al lado del terminal carboxilo de E.

[0152] Aquellos de los péptidos de protección anteriores que abarcan DP son escindibles mediante ácidos débiles, ver más arriba.

[0153] En la forma alternativa, o además, estos péptidos de protección se pueden combinar con cualquier conector de escisión adecuado para permitir sus separación postproducción del péptido antimicrobiano.

[0154] La siguiente tabla muestra cómo calcular el porcentaje de residuos de D y/o E para los ejemplos seleccionados de protección de péptidos.

Péptido de protección	Número de aminoácidos	Número de residuos D/E	Porcentaje de residuos D/E
DP	2	1	50
DDDDDP (SEQ ID N°: 101)	6	5	83
EEEEEDP (SEQ ID N°: 102)	7	6	86
DDDE (SEQ ID N°: 94)	5	5	100
DEDEDEDP (SEQ ID N°: 104)	8	7	88
DDDGEEEGGDDDP (SEQ ID N°: 105)	14	9	64
DDDGDDPPDDDE (SEQ ID N°: 106)	14	10	71

[0155] Los péptidos de protección de la invención se pueden identificar por a) proporcionar un candidato de protección peptídica que comprende al menos un D y/o E; b) preparar un constructo de ADN que comprende una primera secuencia de ADN que codifica el candidato de protección peptídica y una segunda secuencia de ADN que codifica un péptido antimicrobiano; c) transformar una célula huésped con el constructo de ADN de b) y cultivar la

célula huésped transformada para obtener la expresión del constructo de ADN; d) estimar la viabilidad de la célula huésped transformada y/o el rendimiento de péptido antimicrobiano; y e) identificar un candidato de protección peptídica que cuando se usa en un constructo de ADN según el paso b), para la transformación de una célula huésped según la fase c), resulta en una viabilidad aumentada de la célula huésped, y/o un rendimiento aumentado del péptido antimicrobiano, cuando se calcula según el paso d).

[0156] La viabilidad de la célula huésped transformada puede medirse como es bien conocido en la técnica, por ejemplo, mediante medición de densidad óptica (OD) a 450 o 600 nm, por ejemplo a 450 nm. El rendimiento del agente antimicrobiano, por ejemplo el péptido antimicrobiano, se puede estimar en un gel SDS de coomassie manchado, por ejemplo, buscando bandas del peso molecular previsto y, si se desea, también intensidad de banda (véase ejemplo 5).

Vectores de expresión

[0157] La presente invención también se refiere a vectores de expresión recombinantes que comprenden una primera secuencia de ácidos nucleicos que codifica un agente antimicrobiano; una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica una enzima; un promotor y señales de parada traduccionales y transcripcionales.

[0158] Las diferentes secuencias de control y ácidos nucleicos anteriormente descritas se pueden juntar para producir un vector de expresión recombinante que pueda incluir uno o más sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o sustitución de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican la enzima y el agente antimicrobiano en tales sitios. Alternativamente, las secuencias de ácidos nucleicos de la presente invención se pueden expresar mediante la inserción de las secuencias de ácidos nucleicos o un constructo de ácidos nucleicos comprendiendo las secuencias en un vector apropiado para la expresión. En la creación el vector de expresión, las secuencias de codificación se localizan en el vector de modo que las secuencias de codificación se conectan operativamente con las secuencias de control apropiadas para la expresión.

[0159] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (p. ej., un plásmido o virus) que pueda ser convenientemente sometido a procedimientos de ADN recombinante y pueda provocar la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos. La elección del vector dependerá típicamente de la compatibilidad del vector con la célula huésped en que el vector debe ser introducido. Los vectores pueden ser plásmidos circulares lineales o cerrados.

[0160] El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, la replicación del cual es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma, o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser un vector que, al ser introducido en la célula huésped, se integra en el genoma y se replica junto con el/los cromosoma(s) en que ha sido integrado. Además, se puede utilizar un único vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ADN total a introducir en el genoma de la célula huésped, o un transposón.

[0161] Los vectores de la presente invención preferiblemente contienen uno o más marcadores seleccionables que permiten una selección fácil de células transformadas. Un marcador seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia vírica o biocida, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos, y similares. Ejemplos de marcadores seleccionables bacterianos son los genes *dal* de *Bacillus subtilis* o *Bacillus licheniformis*, o marcadores que confieren resistencia antibiótica tales como resistencia a la ampicilina, canamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Marcadores adecuados para células huéspedes de levadura son ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 y URA3. Marcadores seleccionables para su uso en una célula huésped filamentosa fúngica incluyen, pero de forma no limitativa, *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina-carbamoiltransferasa), *bar* (fosfonitrícina acetiltransferasa), *hygB* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrato-reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato-descarboxilasa), *sC* (adeniltransferasa de sulfato), *trpC* (sintasa de antranilato), al igual que equivalentes de los mismos. Preferidos para su uso en una célula de *Aspergillus* son los genes *amdS* y *pyrG* de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y el gen *bar* de *Streptomyces higroscopicus*.

[0162] Los vectores de la presente invención contienen preferiblemente un(os) elemento(s) que permite(n) la integración estable del vector en el genoma de la célula huésped o replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.

[0163] Para la integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede contar con la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la enzima, o la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el agente antimicrobiano, o cualquier otro elemento del vector para la integración estable del vector en el genoma para la recombinación homóloga o no homóloga. Alternativamente, el vector puede contener secuencias de ácidos nucleicos adicionales para dirigir la integración por recombinación homóloga en el genoma de la célula huésped. Las secuencias de ácidos nucleicos adicionales permiten al vector integrarse 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 integradores deberían contener preferiblemente un número suficiente de ácidos nucleicos, tal como 100 a 1.500 pares de bases, preferiblemente 400 a 1.500 pares de bases, y de la forma más preferible 800 a 1.500 pares de bases, que son altamente homólogos con la correspondiente secuencia objetivo para mejorar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos integradores pueden ser cualquier secuencia que sea homóloga a la secuencia objetivo en el genoma de la célula huésped. Además, los elementos integradores pueden ser secuencias

de ácidos nucleicos codificantes o no codificantes. Por otro lado, el vector se puede integrar en el genoma de la célula huésped por recombinación no homóloga.

[0164] Para la replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación permitiendo al vector replicar de manera autónoma en la célula huésped en cuestión. Ejemplos de orígenes bacterianos de replicación son los orígenes de replicación de plásmidos pBR322; pUC19; pACYC177, y pACYC184 permitiendo la replicación en *E. coli*, y pUB110; pE194; pTA1060, y pAMB1 permitiendo la replicación en *Bacillus*. Ejemplos de orígenes de replicación para su uso en una célula huésped de levadura son el origen de micra 2 de replicación, ARS1, ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3, y la combinación de ARS4 y CEN6. El origen de replicación puede ser un origen con una mutación que hace su funcionamiento termosensible en la célula huésped (ver, por ejemplo, Ehrlich, 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 1433).

[0165] Más de una copia de una secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención se puede insertar en la célula huésped para aumentar la producción del producto genético. Un aumento en el número de copias de la secuencia de ácidos nucleicos se puede obtener integrando al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped incluyendo un gen de marcador seleccionable amplificable con la secuencia de ácidos nucleicos cuando las células contienen copias amplificadas del gen de marcador seleccionable, y así copias adicionales de la secuencia de ácidos nucleicos, se pueden seleccionar para cultivar las células en presencia del agente apropiado seleccionable.

[0166] Los procedimientos usados para conectar los elementos anteriormente descritos al constructo de los vectores de expresión recombinantes de la presente invención son conocidos por un experto en la técnica (ver, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, supra).

Células huéspedes

[0167] La presente invención se refiere a células huéspedes recombinantes comprendiendo una primera secuencia de ácidos nucleicos que codifica un agente antimicrobiano, y una segunda secuencia de ácidos nucleicos heteróloga que codifica una enzima.

[0168] Estas células huéspedes son ventajosamente usadas en la producción recombinante del agente antimicrobiano y la enzima. Al menos un vector comprendiendo las secuencias de ácidos nucleicos correspondientes se introduce en una célula huésped, de modo que el vector(es) es mantenido como un integrante cromosómico o como un vector extracromosomal que se duplica como se ha descrito anteriormente. El término "célula huésped" abarca cualquier descendiente de una célula madre que no es idéntico a la célula madre debido a mutaciones que pueden ocurrir durante la replicación. Generalmente, la elección de una célula huésped dependerá en gran parte del gen que codifica el agente antimicrobiano, y/o el gen que codifica la enzima y su fuente. Por ejemplo, se puede seleccionar una célula huésped que no esté afectada, o afectada sólo en una extensión muy limitada, por la actividad antimicrobiana del agente. En la alternativa, la célula huésped se protege de la actividad antimicrobiana mediante la inactivación (extinción) temporal o provisional del péptido. Aún más, generalmente, una enzima fúngica es preferiblemente expresada en una célula huésped fúngica, y una enzima bacteriana en una célula huésped bacteriana.

[0169] La célula huésped puede ser un microorganismo unicelular, por ejemplo, una procarionota, o un microorganismo no unicelular, por ejemplo, una eucariota.

[0170] Células unicelulares útiles son células bacterianas tales como bacterias gram positivas inclusivas, pero no limitadas a, una célula de *Bacillus*, o una célula de *Streptomyces*, o células de bacterias de ácido láctico; o bacterias gram negativas tales como las especies de *E. coli* y *Pseudomonas*. Bacterias del ácido láctico incluyen, pero de forma no limitativa, especies de los géneros *Lactococcus*, *LactoBacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, y *Enterococcus*.

[0171] La introducción de un vector en una célula huésped bacteriana puede, por ejemplo, llevarse a cabo mediante transformación de protoplasto (ver, por ejemplo, Chang y Cohen, 1979, Molecular General Genetics 168: 111-115), usando células competentes (ver, por ejemplo, Young y Spizizin, 1961, Journal of Bacteriology 81: 823-829, o Dubnau y Davidoff-Abelson, 1971, Journal of Molecular Biology 56: 209-221), electroporación (ver, por ejemplo, Shigekawa y Dower, 1988 Biotechniques 6: 742-751), o conjugación (ver, por ejemplo, Koehler y Thorne, 1987, Journal of Bacteriology 169: 5771-5278).

[0172] La célula huésped puede ser una eucariota, tal como una célula de animal no humana, una célula de insecto, una célula vegetal, o una célula fúngica.

[0173] En una forma de realización particular, la célula huésped es una célula fúngica. "Fúngico" como se utiliza en este caso incluye el filo Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, y Zigomycota (como lo definen Hawksworth et al., en Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8ª edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, Reino Unido) al igual que el Oomicota (como se cita en Hawksworth et al., 1995, supra, página 171) y todos los hongos mitospóricos (Hawksworth et al., 1995, supra).

[0174] En otra forma de realización particular, la célula huésped fúngica es una célula de levadura. "Levadura" como se utiliza en este caso incluye levadura ascoesporógena (*Endomycetales*), levadura basidiosporógena y levadura de

los *Fungi Imperfecti* (*Blastomycetes*). Puesto que la clasificación de la levadura puede cambiar en el futuro, para los objetivos de esta invención, la levadura se debe definir como se describe en *Biology and Activities of Yeast* (Skinner, F.A., Passmore, S.M., y Davenport, R.R., eds, Soc. App. Bacteriol. Symposium, Serie N°9, 1980).

5 [0175] La célula huésped de levadura puede ser una célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Yarrowia*.

[0176] La célula huésped fúngica puede ser una célula fúngica filamentosa. "Hongos filamentosos" incluye todas las formas filamentosas de la subdivisión *Eumycota* y *Oomycota* (como lo define Hawksworth et al., 1995, supra). Los hongos filamentosos se caracterizan por el hecho de tener una pared micelial compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano, y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo es por alargamiento hifal y el catabolismo de carbono es estrictamente aeróbico. En cambio, el crecimiento vegetativo por levaduras tal como *Saccharomyces cerevisiae* es por injerto de un talo unicelular y el catabolismo de carbono puede ser fermentativo.

[0177] Ejemplos de células huéspedes filamentosas fúngicas son células de especies de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Thielavia*, *Tolipocladium*, o *Trichoderma*, pero no se limitan a estas.

15 [0178] Las células micóticas se pueden transformar mediante un proceso que implica formación de protoplasto, transformación de los protoplastos, y regeneración de la pared celular en una forma conocida per se. Procedimientos adecuados para la transformación de células huéspedes de *Aspergillus* se describen en EP 238 023 y Yelton et al., 1984, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 81: 1470-1474. Métodos adecuados para la transformación de especies de *Fusarium* son descritas por Malardier et al., 1989, *Gene* 78: 147-156 y WO 96/00787.

20 La levadura se puede transformar usando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, en Abelson, J.N. y Simon, M.I., editores, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology*, volumen 194, págs 182-187, Academic Press, Inc., Nueva York; Ito et al., 1983, *Journal of Bacteriology* 153: 163; y Hinnen et al., 1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences EEUU* 75: 1920.

25 [0179] En una forma de realización particular la célula huésped es una célula huésped microbiana, que incluye células huéspedes bacterianas y células huéspedes fúngicas, tal como se ha definido anteriormente.

Métodos de producción

[0180] La presente invención también se refiere a métodos para producir una enzima y un agente antimicrobiano, el método comprendiendo (a) cultivo de una célula huésped de la invención bajo condiciones propicias para la producción de la enzima y el agente antimicrobiano; y (b) recuperación la enzima y/o el agente antimicrobiano.

30 [0181] En los métodos de producción de la presente invención, las células se cultivan en un medio de cultivo adecuado para la producción de la enzima y el agente antimicrobiano usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula se puede cultivar por cultivo en matraz oscilante, fermentación a gran o pequeña escala (incluyendo fermentaciones continuas de lote, lote alimentado o en estado sólido) en laboratorio o fermentadores industriales realizados en un medio adecuado y bajo condiciones que permiten al polipéptido ser expresado y/o

35 aislado. El cultivo se desarrolla en un medio de cultivo adecuado que comprende fuentes de nitrógeno y carbono y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Hay disponibles medios adecuados de proveedores comerciales o se pueden preparar según las composiciones publicadas (p. ej., en catálogos de la American Type Culture Collection).

40 [0182] Si la enzima y el agente antimicrobiano son secretados en el medio de cultivo, se pueden recuperar directamente del medio de cultivo. Si no son secretados, se pueden recuperar de lisatos de célula.

[0183] La enzima se puede detectar usando métodos conocidos en la técnica que son específicos para la enzima en cuestión. Estos métodos de detección pueden incluir el uso de anticuerpos específicos, formación de un producto de enzima, o desaparición de un sustrato de enzima. Por ejemplo, un ensayo enzimático se puede utilizar para determinar la actividad de la enzima como se describe en este caso. El agente antimicrobiano se puede detectar

45 usando anticuerpos dirigidos contra uno o más epítomos en el péptido, o el péptido puede ser detectado usando actividad antimicrobiana.

[0184] Lo siguiente son ejemplos de productos comúnmente denominados antes como "la enzima y el péptido":

a) Un producto de fusión, que brevemente puede ser designado AMP-ENZ, no obstante, como se ha explicado anteriormente el orden de AMP y ENZ puede invertirse, y el número y el tipo de las entidades individuales de AMP y ENZ pueden variar;

50

b) AMP y ENZ como entidades separadas (variando números y tipos como se ha explicado anteriormente);

c) AMP-Q y ENZ como entidades separadas, la expresión AMP-Q designando la fijación de un dominio (de extinción) de protección para la molécula AMP (nuevamente, números variables, tipos variables, como se ha explicado anteriormente); y

55 d) Un producto de fusión AMP-Q-ENZ (variando números, tipos, posición relativa etc. como se ha explicado anteriormente).

[0185] Según se desee, se puede recuperar sólo la enzima, sólo el agente antimicrobiano, o ambos productos.

[0186] Estos productos se pueden recuperar mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden recuperar mediante procedimientos convencionales incluyendo centrifugado, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación, o precipitación, pero no se limitan a estos.

5 [0187] Los productos se pueden purificar por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo cromatografía (p. ej., intercambio iónico, afinidad, hidrofobia, cromatografía de exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (p. ej., enfoque isoelectro preparatorio), solubilidad diferencial (p. ej., precipitación de sulfato amónico), SDS-PAGE, o extracción (ver, por ejemplo, Protein Purification, J.C. Janson y Lars Riden, editores, VCH Publishers, Nueva York, 1989).

10 [0188] Cuando la enzima y el agente antimicrobiano se expresan como dos productos diferentes, se pueden separar, por ejemplo, por filtración en gel, y la posterior purificación de uno o ambos de estos productos, si se desea o se necesita, se pueden luego seguir vías convencionales como se ha descrito anteriormente.

15 [0189] En una forma de realización particular del método para la producción de la enzima y el agente antimicrobiano, el método comprende un paso de escisión del producto de fusión, es decir, separando el agente antimicrobiano y las partes enzimáticas del producto de fusión. Esto puede hacerse usando agentes de escisión apropiados, de los cuales se han descrito ejemplos anteriormente. El paso de escisión se puede realizar antes, durante o después del procedimiento de recuperación, o la escisión puede hacerse en cualquier momento después de la recuperación, por ejemplo, por un usuario final o por un comprador del producto de fusión, por ejemplo, justo antes del destinado uso final del producto, o como un paso en un procedimiento de preparación de un producto intermedio, por ejemplo, un aditivo de pienso.

20 [0190] En otra forma de realización, en relación con el uso del producto de fusión en pienso para animales, el producto de fusión no está dividido antes de la toma por parte del animal, pero las proteasas digestivas y/o condiciones químicas / físicas en el sistema digestivo del animal en cuestión se encargan de la escisión, y la enzima activa y las moléculas de agente antimicrobianas son, por consiguiente, sólo liberadas in vivo, con la digestión del animal. Las proteasas digestivas son ejemplos de agentes de escisión apropiados para este tipo de forma de realización.

25 [0191] En otra forma de realización del método de la invención, el péptido de protección, o una parte del mismo, se separa de la parte de péptido antimicrobiano en un paso de escisión, que puede ser igual al paso de escisión anteriormente descrito, o en un paso de escisión adicional separado.

30 [0192] Otra forma de realización particular del método de la invención comprende el paso de adición de las moléculas adicionales de enzimas y/o agentes antimicrobianos al producto que resultan del procedimiento de recuperación. Esto podría realizarse con el propósito de obtener un producto con una fracción molar deseada entre el agente(s) antimicrobiano(s) y la(s) enzima(s).

Plantas

35 [0193] La presente invención también se refiere a una planta transgénica, parte de planta, o célula vegetal que ha sido transformada con secuencias de ácidos nucleicos que codifican una enzima y un agente antimicrobiano para expresar y producir éstos en cantidades recuperables. La enzima y el agente antimicrobiano se pueden recuperar de la planta o parte de planta. Alternativamente, la planta o parte de planta que contiene estos productos se puede utilizar como tal para mejorar la calidad de alimentos o pienso, por ejemplo, mejora del valor nutritivo, palatabilidad y propiedades reológicas, o para destruir un factor antinutritivo.

40 [0194] En una forma de realización particular, la enzima y el agente antimicrobiano se dirigen a las vacuolas de almacenamiento de endospermo en semillas. Esto se puede obtener sintetizándolos como un precursor con un péptido señal adecuado, ver Horvath et al en PNAS, Feb. 15, 2000, vol. 97, n°. 4, págs. 1914-1919.

45 [0195] La planta transgénica puede ser dicotiledónea (una dicotiledónea) o monocotiledónea (una monocotiledónea) o variantes creadas genéticamente a partir de las mismas. Ejemplos de plantas monocotiledóneas son hierbas, tales como la poa de los prados (poa pratense, Poa), hierba forrajera tal como festuca, *lolium*, hierbas templadas, tales como *Agrostis*, y cereales, por ejemplo, trigo, avena, centeno, cebada, arroz, sorgo, triticale (híbrido estabilizado de trigo (*Triticum*) y centeno (*Secale*), y maíz. Ejemplos de plantas dicotiledóneas son tabaco, leguminosas, tales como girasol (*Helianthus*), algodón (*Gossypium*), altramuces, patata, remolacha azucarera, guisante, haba y semilla de soja, y plantas crucíferas (familia *Brassicaceae*), tales como la coliflor, semilla de colza, y la *Arabidopsis thaliana*, organismo modelo estrechamente relacionado. Plantas de bajo fitato como se describen por ejemplo en la patente estadounidense n°. 5.689.054 y patente estadounidense n°. 6.111.168 son ejemplos de plantas creadas genéticamente.

50 [0196] Ejemplos de partes de planta son el vástago, callo, hojas, raíz, frutos, semillas, y tubérculos. También se consideran partes de planta tejidos de planta específicos, tales como cloroplasto, apoplasto, mitocondria, vacuola, peroxisomas, y citoplasma. Además, cualquier célula vegetal, sea cual sea el origen del tejido, se considera una parte de planta.

[0197] También se incluyen dentro del campo de la presente invención la progenie de tales plantas, partes de planta y células vegetales.

[0198] La planta transgénica o célula vegetal que expresa un agente antimicrobiano y una enzima de la presente invención se puede construir conforme a métodos conocidos en la técnica. Brevemente, la planta o célula vegetal se construye incorporando uno o más constructos de expresión que codifican la enzima y el agente antimicrobiano en el genoma de la planta huésped y propagan la planta o célula vegetal modificada resultante en una planta transgénica o célula vegetal.

[0199] Convenientemente, el constructo de expresión es un constructo de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la enzima y una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el agente antimicrobiano, operativamente conectado con secuencias reguladoras apropiadas requeridas para la expresión de las mismas en la planta o parte de 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 secuencias de ADN necesarias para la introducción del constructo en la planta en cuestión (esto último depende del método de introducción de ADN usado).

[0200] La elección de secuencias reguladoras, tales como secuencias de terminador y promotor y opcionalmente secuencias de señal y de tránsito son determinadas, por ejemplo, basándose en cuándo, dónde, y cómo el agente antimicrobiano y la enzima se desean expresar. Por ejemplo, la expresión de los genes puede ser constitutiva o inducible, o puede ser desarrollable, específica de tejido o fase, y los productos genéticos pueden tener como objetivo un tejido específico o parte de planta tales como semillas u hojas. Secuencias reguladoras son, por ejemplo, descritas por Tague et al., 1988, Plant Physiology 86: 506.

[0201] Para la expresión constitutiva, el promotor 35S-CaMV puede ser utilizado (Franck et al., 1980, Cell 21: 285-294). Promotores órgano específicos pueden ser, por ejemplo, un promotor de tejidos sumidero de almacenamiento tales como semillas, tubérculos de patata, y frutas (Eduardos & Coruzzi, 1990, Ana. 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 de semilla específica tal como la glutelina, prolamina, globulina, o promotor de albúmina de arroz (Wu et al., 1998, Plant and Cell Physiology 39: 885-889), un promotor de *Vicia faba* de la legúmina B4 y el gen de proteína de semilla desconocida de *Vicia faba* (Conrado et al., 1998, Journal of Plant Physiology 152: 708-711), un promotor de una proteína de cuerpo de aceite de semilla (Chen et al., 1998, Plant and Cell Physiology 39: 935-941), el promotor de proteína de almacenamiento napA de *Brassica napus*, o cualquier otro promotor de semilla específica conocido en la técnica, por ejemplo, como se describe en WO 91/14772. Además, el promotor puede ser un promotor de hoja específica tal como el promotor rbcS de arroz o tomate (Kyoizuka et al., 1993, Plant Physiology 102: 991-1000), el promotor de gen de metiltransferasa de adenina de virus de *Chlorella* (Mitra y Higgins, 1994, Plant Molecular Biology 26: 85-93), o el promotor de gen de arroz aldP (Kagaia et al., 1995, Molecular and General Genetics 248: 668-674), o un promotor inducible dañado tal como el promotor de patata pin2 (Xu et al., 1993, Plant Molecular Biology 22: 573-588).

[0202] Un elemento promotor intensificador puede también usarse para conseguir una expresión mayor de la enzima y el agente antimicrobiano en la planta. Por ejemplo, el elemento promotor intensificador puede ser un intrón que se coloca entre el promotor y la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención. Por ejemplo, Xu et al., 1993, supra divulga el uso del primer intrón del gen de actina de arroz 1 para mejorar la expresión.

[0203] Aún más, el uso del codón se puede optimizar para las especies vegetales en cuestión para mejorar la expresión (ver Horvath et al mencionado anteriormente).

[0204] El gen de marcador seleccionable y cualquier otras partes del constructo de expresión se pueden elegir de aquellas disponibles en la técnica.

[0205] El constructo de ácidos nucleicos se incorpora en el genoma de la planta según técnicas convencionales conocidas en la técnica, incluyendo transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación mediada de virus, microinyección, bombardeo de partícula, transformación biolística, y electroporación (Gassen et al., 1990, Science 244: 1293; Potrikus, 1990, Bio/Technology 8: 535; Shimamoto et al., 1989, Nature 338: 274).

[0206] Actualmente, la transferencia génica mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es el método de elección para generar dicotiledóneas transgénicas (para una revisión, ver Hooikas y Schilperoort, 1992, Plant Molecular Biology 19: 15-38). No obstante, esto puede también usarse para monocotiledóneas de transformación, 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 de tungsteno revestidas con el ADN transformador) 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 de protoplasto como se describe en Omirulleh et al., 1993, Plant Molecular Biology 21: 415-428.

[0207] Después de la transformación, los transformantes que incorporan el constructo de expresión se seleccionan y regeneran en plantas completas según métodos bien conocidos en la técnica.

[0208] La presente invención también se refiere a métodos para producir una enzima y un agente antimicrobiano, el método que comprende (a) el cultivo de una planta transgénica o una célula vegetal comprendiendo las secuencias de ácidos nucleicos de codificación bajo condiciones propicias para la producción del agente antimicrobiano y el enzimático; y (b) la recuperación de estos.

5 **Animales**

[0209] La presente invención también se refiere a un animal transgénico no humano y a productos o elementos del mismo, por ejemplo líquidos biológicos tales como leche y sangre, órganos, carne y células animales. Técnicas para expresar proteínas, por ejemplo, en células mamíferas, se conocen en la técnica, ver por ejemplo el manual Protein Expression: A Practical Approach, Higgins y Hames (eds) Oxford University Press (1999), y los otros tres manuales de esta serie acerca de la transcripción genética, maduración del ARN y tratamiento postraduccional. En términos generales, para preparar un animal transgénico, se transforman células seleccionadas de un animal seleccionado con secuencias de ácidos nucleicos que codifican una enzima y un agente antimicrobiano para expresar y producir estos. El agente y la enzima se pueden recuperar del animal, por ejemplo de la leche de animales hembra, o se pueden expresar al beneficio del mismo animal, por ejemplo, para ayudar a la digestión del animal. Ejemplos de animales se mencionan a continuación en la sección titulada Alimentos para animales.

[0210] Para producir un animal transgénico con el propósito de recuperar el agente antimicrobiano y la enzima de la leche del animal, las secuencias de ácidos nucleicos de codificación se pueden insertar en los huevos fertilizados del animal en cuestión, por ejemplo usando vectores de expresión transgénicos que comprenden un promotor de proteínas de la leche adecuadas, y las secuencias de ácidos nucleicos deseadas. El vector de expresión transgénico se microinyecta en huevos fertilizados, y preferiblemente se integra de forma permanente en el cromosoma. Un vez el huevo empieza a crecer y a dividirse, el embrión potencial se implanta en una madre de alquiler, y se identifican los animales que llevan el transgénico. El animal resultante puede después ser multiplicado por cultivo convencional. La enzima y el agente se pueden purificar de la leche del animal, ver por ejemplo Meade, H.M. et al (1999): Expression of recombinant proteins in the milk of transgenic animals, Gene expression systems: Using nature for the art of expression. J. M. Fernandez y J. P. Hoeffler (eds.), Academic Press.

[0211] En la alternativa, para producir un animal transgénico no humano que lleve en su genoma células somáticas y/o embrionarias, una secuencia de ácidos nucleicos que incluye unos transgénicos incluyendo transgénicos que codifican el agente antimicrobiano y la enzima, el transgénico puede conectarse operativamente a una primera secuencia reguladora para la expresión específica de glándula salival, como se describe en WO 00/064247.

30 **Composiciones**

[0212] En otro aspecto, la presente invención se refiere a composiciones comprendiendo el producto de fusión de agente antimicrobiano y enzima, si se desea con un péptido de protección (tal como AMP-(Q)-ENZ), como se ha descrito anteriormente.

[0213] Estas composiciones se pueden preparar conforme a métodos conocidos en la técnica y puede ser en forma de un líquido o una composición seca. Por ejemplo, pueden estar en forma de granulados o microgranulados. La enzima y el agente antimicrobiano a ser incluidos en la composición se pueden estabilizar conforme a métodos conocidos en la técnica.

[0214] Más adelante se dan ejemplos de usos preferidos de la enzima y el agente antimicrobiano de la invención.

Alimentos para animales

[0215] El término animal incluye todos los animales, seres humanos incluidos. Ejemplos de animales son rumiantes y no rumiantes. Animales rumiantes incluyen, por ejemplo, animales tales como ovejas, cabras, caballos, y ganado bovino, por ejemplo vacas y terneros jóvenes. En una forma de realización particular, el animal es un animal no rumiante. Animales no rumiantes incluyen animales monogástricos, por ejemplo cerdos o puercos (incluyendo, pero no limitándose a, lechones, cerdos en crecimiento, y cerdos hembra); aves tales como pavos, patos y pollos (incluyendo pero no limitándose a pollos para cocinar); terneros jóvenes; y pescado (incluyendo pero no limitándose a salmón, trucha, tilapia, siluro y carpas); y crustáceos (incluyendo pero no limitándose a gambas y cigalas).

[0216] El término pienso o composición alimentaria se refiere a cualquier compuesto, preparación, mezcla, o composición adecuada para, o destinada a la ingesta por parte de un animal.

[0217] En el uso según la invención la enzima y el agente antimicrobiano se pueden suministrar al animal antes, después, o simultáneamente con la dieta. Éste último es el preferido.

[0218] En una forma de realización particular, la enzima y el agente antimicrobiano, en la forma en que se añaden al pienso, o cuando se incluyen en un aditivo de pienso, están bien definidos. Bien definido significa que la preparación es al menos un 50% pura como se determina por cromatografía de exclusión de tamaño (véase ejemplo 12 de WO 01/58275). En otras formas de realización particulares la preparación es al menos un 60, 70, 80, 85, 88, 90, 92, 94, o al menos un 95% pura como se determina mediante este método.

[0219] Una preparación bien definida es ventajosa. Por ejemplo, es mucho más fácil dosificar correctamente al alimento una preparación de enzima y agente antimicrobiano que está esencialmente libre de interferir o contaminar

otros ingredientes. El término dosificar correctamente se refiere en particular al objetivo de obtener resultados constantes y consistentes, y a la capacidad de optimizar la dosificación basada en el efecto deseado.

[0220] Para el uso en pienso para animales, no obstante, la enzima y el agente antimicrobiano no necesitan ser tan puros; pueden incluir por ejemplo enzimas o agentes adicionales.

5 [0221] La preparación puede (a) añadirse directamente al pienso (o usarse directamente en un proceso de tratamiento de proteínas), o (b) se puede usar en la producción de una o más composiciones intermedias tales como aditivos alimenticios o premezclas que se añaden posteriormente al pienso (o usarse en un proceso de tratamiento). El grado de pureza anteriormente descrito se refiere a la pureza de la enzima original y a la preparación de agente antimicrobiano, si se usa según (a) o (b).

10 [0222] El pienso para animales normalmente comprende proteínas vegetales, por ejemplo derivados de leguminosas y cereales, por ejemplo materiales de plantas de las familias *Fabaceae* (*Leguminosae*), *Cruciferaeae*, *Chenopodiaceae*, y *Poaceae*, tales como harina de soja, harina de lupino y comida de semilla de colza. El pienso puede también comprender una proteína animal, tal como harina de carne y hueso, y/o harina de pescado.

15 [0223] En una forma de realización particular, la proteína vegetal deriva de una o más plantas de la familia *Fabaceae*, por ejemplo semilla de soja, altramuza, guisante, o judía.

[0224] En otra forma de realización particular, la proteína vegetal deriva de una o más plantas de la familia *Chenopodiaceae*, por ejemplo remolacha, remolacha azucarera, espinaca o quinua.

[0225] Otros ejemplos de fuentes de proteína vegetal son la semilla de colza, semilla de girasol, semilla de algodón, y repollo.

20 [0226] La semilla de soja es una fuente de proteína vegetal preferida.

[0227] Otros ejemplos de fuentes de proteína vegetal son cereales tales como cebada, trigo, centeno, avena, maíz, arroz, triticale y sorgo.

[0228] En una forma de realización particular, la enzima y el agente antimicrobiano mejoran el valor nutritivo de un pienso para animales, es decir, por ejemplo el índice de crecimiento y/o el aumento de peso y/o la conversión de pienso (es decir, el peso de pienso ingerido en relación con la ganancia de peso).

25 [0229] La enzima y el agente antimicrobiano se pueden añadir al pienso en cualquier forma, como un producto relativamente puro, o en aditivo con otros componentes destinados para la adición al pienso para animales, es decir, en forma de aditivos de pienso, tales como las denominadas premezclas para pienso para animales.

30 [0230] En otro aspecto la presente invención hace referencia a composiciones para su uso en pienso para animales, tales como pienso para animales, y aditivos de pienso, por ejemplo, premezclas.

[0231] Además de la enzima y el agente antimicrobiano de la invención, los aditivos de pienso de la invención contienen al menos una vitamina liposoluble, y/o al menos una vitamina soluble en agua, y/o al menos un oligoelemento, y/o opcionalmente al menos un macromineral.

35 [0232] Además, ingredientes de aditivos de pienso opcionales son agentes colorantes, por ejemplo carotenoides tales como beta-caroteno, astaxantina, y luteína; compuestos de aroma; estabilizadores; ácidos grasos poliinsaturados; especies generadoras de oxígeno reactivo.

40 [0233] Normalmente las vitaminas grasas e hidrosolubles, al igual que los oligoelementos, forman parte de una premezcla destinada para la adición al pienso, mientras que los macrominerales se añaden normalmente por separado al pienso. Cualquiera de estos tipos de composición, cuando se enriquecen con la enzima y el agente antimicrobiano de la invención, son un aditivo de pienso de la invención.

[0234] Lo siguiente son listas no exclusivas de ejemplos de estos componentes:

Ejemplos de vitaminas liposolubles son la vitamina A, vitamina D3, vitamina E, y vitamina K, por ejemplo, vitamina K3.

45 [0235] Ejemplos de vitaminas hidrosolubles son la vitamina B12, biotina y colina, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, niacina, ácido fólico y pantotenato, por ejemplo pantotenato Ca-D.

[0236] Ejemplos de oligoelementos son el manganeso, zinc, hierro, cobre, yodo, selenio, y cobalto.

[0237] Ejemplos de macrominerales son el calcio, fósforo y sodio.

[0238] Ejemplos de ácidos grasos poliinsaturados son los ácidos grasos poliinsaturados C18, C20 y C22, tales como ácido araquidónico, ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentanoico y ácido gamma-linolénico.

50 [0239] Ejemplos de especies generadoras de oxígeno reactivo son productos químicos tales como el perborato, persulfato o percarbonato; y enzimas tales como una oxidasa, una oxigenasa o una sintetasa.

[0240] Una composición de pienso para animales según la invención tiene un contenido bruto de proteínas de 50-800 g/kg, y además comprende al menos una enzima y agente antimicrobiano de la invención.

5 [0241] La proteína cruda se calcula como nitrógeno (N) multiplicado por un factor 6,25, es decir, proteína cruda (g/kg) = N (g/kg) x 6,25. El contenido de nitrógeno se determina por el método Kjeldahl (A.O.A.C., 1984, Official Methods of Analysis 14th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington DC).

[0242] En una forma de realización particular, la composición de pienso para animales de la invención contiene al menos una proteína vegetal o fuente de proteína tal como se ha definido anteriormente. Puede también contener proteína animal, tal como harina de carne y hueso, y/o harina de pescado, típicamente en una cantidad de 0-25%.

10 [0243] En formas de realización todavía más particulares, la composición de pienso para animales de la invención contiene 0-80% de maíz; y/o 0-80% de sorgo; y/o 0-70% de trigo; y/o 0-70% de cebada; y/o 0-30% de avena; y/o 0-40% de harina de soja; y/o 0-10% de harina de pescado; y/o 0-20% de suero.

15 [0244] Dietas para animales pueden p. ej. fabricarse como pienso triturado (no granulado) o pienso granulado. Típicamente, los materiales de pienso molido se mezclan y se añaden cantidades suficientes de vitaminas esenciales y minerales según las especificaciones para las especies en cuestión. La enzima y el agente antimicrobiano se pueden añadir en formulaciones sólidas o líquidas. Por ejemplo, una formulación sólida se añade típicamente antes o durante el paso de mezcla; y una preparación líquida se añade típicamente después del paso de granulación. La enzima y el agente antimicrobiano también se pueden incorporar en un aditivo de pienso o premezcla.

Ejemplos

20 [0245] Generalmente, se hace referencia a Sambrook, Fritsch, y Maniatis, 1989, para los varios protocolos estándar empleados en la presente parte experimental.

Ejemplo 1: Ensayo de la actividad antimicrobiana

[0246] Este ensayo es particularmente útil para la evaluación de la actividad antimicrobiana de la novispirina y PR39. Se basa en el protocolo de Lehrer et al. (1991), J. Immunol. Methods 137: 167-173.

25 [0247] Las bacterias objetivo seleccionadas, p. ej. *E.coli* ATCC 10536, o *B.subtilis* ATCC 6633 (10⁶ unidades formadoras de colonias (CFU)) fueron añadidas a 10 ml de agarosa subyacente (1% de agarosa de electroendosmosis baja, 0,03% de caldo tripticasa de soja, 10 mM de fosfato sódico, pH 7.4, 37° C). La suspensión fue solidificada en una placa de Petri INTEGRID (Becton Dickinson Labware, NJ). Una troqueladora de gel de 3 mm se usó para perforar la agarosa subyacente (Amersham Pharmacia Biotech, Suecia). Muestras que se espera que presenten actividad antimicrobiana fueron añadidas a los agujeros e incubadas a 37 °C durante 3 horas. Un revestimiento (medio LB, 7,5% de agar) se vertió encima y la placa fue incubada durante toda la noche a 37 °C. Se vio actividad antimicrobiana como zonas de compensación alrededor de los pozos. Células vivas fueron teñidas añadiendo 10 ml, 0,2 mM MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5. bromuro de difeniltetrazolium; tiazolil azul).

30

Ejemplo 2: uso de dominios de extinción para la expresión de agentes antimicrobianos como cuerpos de inclusión en *E.coli*

35

[0248] PR39 es un péptido rico en arginina y prolina que fue originalmente aislado del intestino de cerdo basándose en la actividad antimicrobiana (Agerbert, B. et al., Eur. J. Biochem. 202, 849-54 (1991)). La forma madura de PR39 está compuesta de los siguientes 39 aminoácidos: RRRPRPPYLPRPRPPFFPPRLPPRIPPGFPPRFPPRFPP (SEC ID n°: 65)

40 [0249] La expresión de péptidos antimicrobianos como p. ej. PR39 en cuerpos de inclusión muestra dificultades por razones que no se entienden completamente. En este experimento evaluamos el efecto en el nivel de expresión del uso de varios dominios de protección peptídicos de la invención.

[0250] Los siguientes constructos de fusión fueron hechos en el sistema de vector de expresión pET31b+ (disponible comercialmente de NOVAGEN):

45 PHM300: KSI-NG-PR39

PHM370: KSI-DP-PR39

PHM360: KSI-DDDDDP(SEQ ID N°: 101)-PR39 (SEC ID n°: 65)

PHM350: KSI-EEEEEDP(SEQ ID N°: 102)-PR39 (SEC ID n°: 65)

50 [0251] KSI es un fragmento insoluble de isomerasa cetosteroides que es conocido por promover la expresión como cuerpos de inclusión insolubles del péptido o proteína de interés. KSI forma parte del sistema de vector de expresión pET31b+ .

[0252] PR39 designa la secuencia de aminoácidos del péptido maduro PR39 (SEC ID n°: 65).

[0253] DP (Asp-Pro), DDDDDP (Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Pro) (SEC ID n°: 101), y EEEEEEDP (Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Asp-Pro) (SEC ID N°: 102) son ejemplos de dominios de protección peptídica de la presente invención.

[0254] NG (Asn-Gly) es un ejemplo de un conector que no es un dominio de protección de la invención.

[0255] Plásmidos recombinantes fueron transformados en una cepa de *Escherichia coli* BL21-DE3 (forma parte del equipo pET31 b+) y la expresión de PR39 fue evaluada a través de inducción IPTG y SDS-PAGE. Los resultados mostraron claramente el aumento de la expresión de constructos PHM 370, 360 y 350 en comparación con PHM300.

5 Aún más, los niveles de expresión fueron claramente aumentados por el constructo PHM350 en comparación con los constructos PHM360 y PHM370, y por el constructo PHM360 en comparación con el constructo PHM370.

[0256] Después de la expresión, los productos de fusión resultantes se pueden dividir por tratamiento con un ácido débil (sitio de escisión: D- /-P), por el cual el péptido antimicrobiano recupera su actividad antimicrobiana.

Ejemplo 3: uso de dominios de extinción en la expresión de agentes antimicrobianos en un sistema de expresión suicida de *E.coli*

10

[0257] Este ejemplo hace uso del Sistema de Expresión Suicida (SES) como se describe en WO 00/73433, ver en particular el Ejemplo 1.

[0258] La célula huésped usada es *Escherichia coli* TOP10 que está comercialmente disponible de Invitrogen (araBADC⁻, araEFGH⁺).

15 [0259] Los plásmidos de serie pHH (usando plásmido pBAD/gIII A) permiten la exportación de los péptidos antimicrobianos al espacio periplásmico de *E.coli*, de donde los péptidos pueden interactuar con las membranas celulares. El plásmido pBAD/gIII A está comercialmente disponible de Invitrogen. Es un vector de expresión pUC-derivado diseñado para la expresión regulada de proteína recombinante en *E.coli*. Este plásmido permite la clonación de péptidos y proteínas tóxicas a *E.coli*, como ninguna expresión de los péptidos recombinantes ocurre en ausencia de un inductor en el medio de crecimiento. No obstante, la transcripción y por lo tanto síntesis peptídica, puede ser extensivamente inducida. En la serie pHH, la secuencia señal gen III en pBAD/gIII A está localizado delante del promotor inducible para mediar la secreción del péptido/proteína en cuestión. El gen III codifica pIII, una de las proteínas cápsidas menores del fago filamentoso fd. pIII se sintetiza con un aminoácido 18, secuencia señal N-terminal, y requiere que el sistema bacteriano Sec se inserte en la membrana. La secuencia señal se quita después atravesando la membrana interna, dejando así el péptido maduro. Un sitio de restricción NcoI sucede inmediatamente al sitio de escisión de secuencia señal.

20

25

[0260] El gen(es) que codifica(n) el péptido(s) antimicrobiano se inserta(n) en plásmidos de la serie pHH como fragmentos NcoI-XbaI. En caso del PR39, esto resulta en una introducción de aminoácidos MA en el N-Terminal del péptido (CCATGG). El uso de codón natural se conserva.

30 [0261] Cinco extensiones de N-terminal diferentes de PR39 fueron construidas, es decir: E, DE, DDE, DDDE (SEC ID n°: 103) y DDDDE (SEC ID n°: 94).

[0262] Estos derivados PR39 fueron hechos por PCR en una reacción PCR estándar usando un cebador directo específico en relación con un cebador inverso general pBAD-Rev, los cuales se exponen a continuación. El molde PCR era un plásmido pHH que codifica la cepa natural PR39 (wt PR39), SEC ID n°: 65.

35 [0263] Los fragmentos de la PCR fueron purificados, restringidos con NcoI y XbaI y clonados en los sitios correspondientes en pHH. La secuencia de estos constructos fue verificada por secuenciación del ADN que usa los cebadores pBAD-forw y pBAD-rev, ver a continuación.

[0264] Los resultados de la prueba en el sistema SES fueron que cada uno de los cinco derivados de PR39 resultaron en una inhibición disminuida en comparación con la inhibición de peso de PR-39. Una reducción en la inhibición es indicativa de una reducción en la actividad antimicrobiana y por lo tanto indicativa de una extinción eficaz. También se observó una inhibición que disminuyó gradualmente a lo largo de la serie siguiente de extensiones N-terminales: E, DE, DDE, DDDE (SEC ID n°: 103) y DDDDE (SEC ID n°: 94). En otras palabras, la inhibición más grande fue observada con E, seguida de DE, luego por DDE, luego por DDDE (SEC ID n°: 103), mientras que DDDDE (SEC ID n°: 94) mostró la menor inhibición en este experimento.

45 [0265] Estos son los cebadores que fueron usados para amplificar y secuenciar los cinco derivados de PR-39:

pHH1531 (E-PR39)

Cebador pHH1531-Directo:

catagcacatggaaggagacgtccccgaccccatatttgcc (SEC ID n°: 66)

50 pHH1532 (DE-PR39) cebador pHH1532-Directo:

catagcacatggatgaaggagacgtccccgaccccatatttgcc (SEC ID n°: 67)

pHH1533 (DDE-PR39)

Cebador pHH1533-Directo:

catagcacatggacgatgaaaggagacgtccccgaccccatattgcc (SEC ID n°: 68)

pHH1534 (DDDE-PR39) cebador pHH1534-Directo:

5 catagcacatggacgatgaaaggagacgtccccgaccccatattgcc (SEC ID n°: 69)

pHH1535 (DDDDE-PR39) cebador pHH1535-Directo:

catagcacatggacgatgaaaggagacgtccccgaccccatattgcc (SEC ID n°: 70)

10 pBAD-Directo:

CCATAAGATTAGCGGATCCTACC (SEC ID n°: 71)

PBAD-inverso:

CTCTCATCCGCCAAAACAGCC (SEC ID n°: 72)

15

Ejemplo 4: uso de dominios de extinción en la expresión y secreción de agentes antimicrobianos en levadura

[0266] Este ejemplo ilustra la expresión y secreción de dos péptidos antimicrobianos diferentes, novispirina y PR39, en la levadura de *Saccharomyces cerevisiae* usando dominios de extinción específicos.

20 [0267] Novispirina G10 es un péptido antimicrobiano compuesto por los siguientes aminoácidos: KNLRRRIIRKGIHIIKKYG (SEC ID n°: 73).

[0268] Primero se hicieron cinco constructos de fusión PR39 diferentes, es decir E-PR39; DE-PR39; DDE-PR39, DDDE(SEQ ID N°: 103)-PR39 y DDDDE(SEQ ID N°: 94)-PR39.

25 [0269] Como algunas proteasas específicamente disocian después residuos de ácido glutámico (E), el dominio de extinción añadido puede ser liberado del AMP permitiendo el control de la actividad antimicrobiana del AMP.

[0270] Los derivados de PR39 fueron amplificados usando cebadores directos específicos y un cebador inverso general pBAD, que son indicados debajo en una reacción PCR estándar. Los moldes PCR usados fueron aquellos generados en el ejemplo 3.

Derivado	Molde PCR	Cebador directo	Cebador inverso
pHH3857 (E-PR39)	pHH1531	pHH3857 directo	pBAD inverso
pHH3858 (DE-PR39)	pHH1532	pHH3858 directo	pBAD inverso
pHH3859 (DDE-PR39)	pHH1533	pHH3859 directo	pBAD inverso
pHH3860 (DDDE-PR39)	pHH1534	pHH3860 directo	pBAD inverso
pHH3861 (DDDDE-PR39)	pHH1535	pHH3861 directo	pBAD inverso

30 Secuencias de los cebadores

[0271]

pHH3857 directo:

AGGGGTATCGATGGCTAAGAGAGAAGCCGAAAGGAGACGTCCCCGACCC (SEQ ID N°: 74)

pHH3858 directo:

AGGGGTATCGATGGCTAAGAGAGAAGCCGATGAAAGGAGACGTCCCCGACCCC (SEQ ID N°: 75)

5 pHH3859 directo:
AGGGGTATCGATGGCTAAGAGAGAAGCCGACGATGAAAGGAGACGTCCCCGACCCC (SEQ ID N°: 76)

pHH3860 directo:

AGGGGTATCGATGGCTAAGAGAGAAGCCGATGACGATGAAAGGAGACGTCCCCGACCCC (SEQ ID NO: 77)

10 pHH3861 directo:
AGGGGTATCGATGGCTAAGAGAGAAGCCGACGATGACGATGAAAGGAGACGTCCCCGACCCC (SEQ ID NO: 78)

[0272] Los cinco fragmentos PCR resultantes fueron purificados, restringidos con ClaI y XbaI y clonados en un vector de expresión de levadura adecuado tal como el vector disponible comercialmente pYES2. Los cinco derivados fueron verificados mediante secuenciación de ADN, y transformados en una cepa adecuada de *S. cerevisiae* usando un protocolo de PEG/LiAc.

[0273] Se observaron bandas diferentes con el peso molecular previsto en cada uno de los cinco cultivos indicando expresión de los péptidos. De nuevo ocurrió que cuanto más tiempo duraban los dominios de extinción, mayores eran las cantidades producidas del péptido antimicrobiano, la efectividad crecía en el orden E < DE < DDE < DDDE < DDDDE. No se observaron bandas en sobrenadantes de células de levadura que contienen el plásmido de control (sin péptido antimicrobiano).

[0274] Las muestras que codificaban PR-39 mostraban diferentes bandas de los tamaños anticipados en geles de Tricina SDS-PAGE (Schaggen & Von Jagow (87) Anal. Bioch. 166, 368 - 379).

[0275] Antes de la digestión con la proteasa C-componente no se detectó ninguna actividad antimicrobiana en sobrenadantes en los que se analizó la actividad antimicrobiana como se describe en el ejemplo 1. Sin embargo, después de la separación de los dominios de extinción del péptido antimicrobiano, se observaron zonas de compensación en las muestras codificantes PR39. Ninguna zona de compensación fue detectada en muestras de control.

[0276] De la misma manera como se ha descrito anteriormente, se hicieron más constructos en levadura y resultaron permitir la expresión y secreción satisfactoria del péptido antimicrobiano. Los otros constructos fueron los siguientes:

- 30 pHH3864: E-novispirina (SEC ID n°: 73)
- pHH3865: DDE-novispirina (SEC ID n°: 73)
- pHH3866: DDDDE(SEQ ID N°: 94)-novispirina (SEC ID n°: 73)
- pHH3879: DEDEDEDP(SEQ ID N°: 104)-novispirina (SEC ID n°: 73)
- pHH3880: DEDEDEDP(SEQ ID N°: 104)-PR-39 (SEC ID n°: 65)
- 35 pHH3883: DDDGGEEEGDDDDP(SEQ ID N°: 105)-PR-39 (SEC ID n°: 65)
- pHH3884: DDDGGDDDDPPDDDE(SEQ ID N°: 106)-PR-39 (SEC ID n°: 65).

Ejemplo 5: Aprovechamiento de la distancia entre el dominio de extinción y el agente antimicrobiano

[0277] Para investigar el efecto de la distancia traduccional entre el péptido antimicrobiano y el dominio de extinción, dos nuevos constructos fueron creados. Una disposición de expresión similar a la descrita primero en el ejemplo 4 fue empleada, es decir un vector derivado pYES2 que utiliza la guía de alfa para permitir la secreción de los péptidos producidos.

[0278] En un constructo, pHH3891, un conector de glicina de ocho aminoácidos fue insertado entre PR-39 (SEC ID n°: 65) y el dominio de extinción DDDDE (SEC ID n°: 94). En el otro constructo, pHH3892, se usó un conector de glicina de doce aminoácidos. Los plásmidos fueron construidos por métodos de biología molecular estándar, verificados por secuenciación del ADN y transformados en levadura como se describe en el ejemplo 4.

pHH3891 (SEC ID nº: 117):

DDDDE-GGGGGGGGGE-RRRPRPPYLPRRPPPPFFPPRLPPRIPPGFPPRFPPRF

pHH3892 (SEC ID nº: 118):

DDDDE-GGGGGGGGGGGGGE-RRRPRPPYLPRRPPPPFFPPRLPPRIPPGFPPRFPPRF

5 [0279] Dos transformantes independientes de cada uno de los dos constructos se cultivaron en la solución mínima de levadura SC (ver pág. 174 en *Methods in Yeast Genetics 2000* A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual by Dan Burke, ISBN 0- 87969-588-9 / 0879695889) suplementado con un 2% de glucosa e incubado bajo agitación a 35°C durante 3 días. Los sobrenadantes fueron recolectados y analizados en geles de Bis-Tris según lo recomendado por el fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU).

10 [0280] Los cuatro sobrenadantes contenían un péptido con el tamaño previsto y aparente de 6 kDa. Los péptidos producidos en pHH3891 y pHH3892 tienen un peso molecular teórico (PM) de 6006 Da y 6234 Da, respectivamente.

[0281] Los resultados indican flexibilidad en cuanto a la distancia traduccional entre el AMP y el dominio de extinción (péptido de protección).

Ejemplo 6: coexpresión de una enzima y un agente antimicrobiano

15 [0282] Este ejemplo ilustra la coexpresión en, y la secreción de, bacterias recombinantes de una enzima de pectato liasa y cualquiera de dos péptidos antimicrobianos, como proteínas de fusión.

[0283] El gen que codifica un pectato liasa derivado de *Bacillus licheniformis* (aminoácidos 28-341 de SEC ID nº: 2 de WO 00/75344) y a) un péptido antifúngico (AFP) de *Aspergillus giganteus* (SEC ID nº: 2 de WO 94/01459), o b) el péptido antimicrobiano designado G10 novispirina (un péptido artificial con SEC ID nº: 17 de la patente estadounidense nº. 6,492,328), fue insertado y hecho el gen de resistencia de cloranfenicol en el locus amyE en el cromosoma de *Bacillus subtilis*. La cepa huésped de *B. subtilis* usada fue la cepa carente de proteasa designada WB600asn (un derivado sensible al cloranfenicol de cepa de *B. subtilis* WB600 que se describe en *J. Bact.* 1991. págs. 4952-4958). Ambas proteínas de fusión de acuerdo con a) y b) arriba fueron segregadas en el caldo de cultivo.

20 [0284] El casete de expresión fue un promotor amyQ de *Bacillus amyloliquefaciens* delante del promotor crIII A más el elemento de estabilización ARNm de *Bacillus thuringiensis*. (ver patente estadounidense nº 6.255.076, en particular el neo sistema pDG268 mostrado en la Fig. 19 del mismo).

25 [0285] Los siguientes fragmentos de ADN fueron preparados:

(A) La secuencia Shine Delgarno (SD) y el péptido señal fueron derivados del gen amyL de *Bacillus licheniformis* (ATCC 14580), es decir como el fragmento PCR amplificado por debajo de los cebadores 1 y 2 con colas Sac1 y Pst1:

Cebador 1: tatagagctCCATTGAAAGGGGAGGAGAATC-3' (SEC ID nº: 107)

Cebador 2: tataCTGCAGAATGAGGCAGCAAGAAGATGAGC-3' (SEC ID nº: 108);

(B) la región de codificación del gen de pectato liasa fue también derivada de *Bacillus licheniformis* (ATCC 14580), es decir como el fragmento PCR amplificado por debajo de los cebadores 3 y 4 con colas Pst1 y Nhe1:

35 Cebador 3: tataCTGCAGCCGCGGCAGCTTCTGCCTTAAAC-3' (SEC ID nº: 109)

Cebador 4: tataGCTAGCTGGATTGATTTGCCGACTCCG-3' (SEC ID nº: 110);

(C1) Un gen sintético con la región de codificación para la secuencia AFP (nucleótidos 1066-1218 de SEC ID nº: 111) con colas Nhe1 y Mlu1.

Cebador 5: tataacgctTCTAGCAGTGGCACTTG-3' (SEC ID nº: 113)

40 (C2) Un gen sintético con la región de codificación para la secuencia de novispirina G10 (nucleótidos 1236-1289 de SEC ID nº: 114) con colas Nhe1 y Mlu1.

Cebador 6: tataacgctTTATCCGTATTTCTTAATG-3' (SEC ID nº: 116)

[0286] Los tres fragmentos ((A) + (B) + (C1)), o ((A) + (B) + (C2)) fueron reunidos después de la digestión de enzima de restricción (Pst1 + Nhe1), ligación de ADN y amplificación PCR (PP1223-9 cebador PCR 1 + cebador 5, molde de ADN: ligación de fragmento (A) + (B) + (C1)), (PP1331-2 cebador PCR 1 + cebador 6, molde de ADN: ligación de fragmento (A) + (B) + (C2)), y finalmente insertados en la parte de vector del plásmido pDG268neo como un fragmento Sac1 Mlu1 (el único sitio Mlu1 se sitúa en la parte C-terminal del gen Savinase en el plásmido pDG268neo).

50 [0287] El plásmido con el casete de expresión anterior y el gen flanqueado por secuencias amyE fue luego transferido a células competentes de *Bacillus subtilis* WB600. Entre los transformantes resistentes al cloranfenicol una colonia con el casete de expresión correcto insertado en el gen amyE fue aislado, y la secuencia de genes del péptido de fusión de pectato liasa insertada confirmada por secuenciación del ADN.

[0288] En la cepa de *Bacillus subtilis* PP1223-9 el gen de pectato liasa se funde en bastidor a la secuencia de ADN que codifica el AFP de *Aspergillus giganteus*. La proteína de fusión segregada de PP1223-9 (aminoácidos 1-368 de SEC ID n°: 112) fue identificada como una banda del tamaño correcto (40 kDal) ejecutando el caldo de cultivo en un gel SDS PAGE:

MKQQKRLYARLLTLLFALIFLLPHSAAAAASALNSGKVNPLADFSLKGFALNGGTTGG
EGGQTVTVTTGDQLIAALKNKNANTPLKIYVNGTITTSNTSASKIDVKDVSNSVIVGSGTKGELK
GIGIKIWRANNIIIRNLKIHEVASGDKDAIGIEGPSKNIWVDHNELYHSLNVDKDYDGLFDVKRD
AEYITFSWNYVHDGWKSMLMGSSSDSNYNRTITFHNNWFENLNSRVPSFRFGEGHIYNNYF
NKIIDSGINSRMGARIRIENNLFENAKDPIVSWYSSSPGYWHVSNKFNNSRGSMPPTTSTTTY
NPPYSYSLDNVDNVKSIVKQAGVGKINPASEATYPGKCYKKNICKYKAQSGKTGICQCYVK
RCPRDGAKCDLSYK GKCHC (SEQ ID NO: 112).

El fragmento de ADN correspondiente a la SEC ID n°: 112 es el PP1223-9 Sac1 Mlu1 fragmento de ADN de la SEC ID n°: 111.

[0289] La parte de péptido señal N-terminal de la SEC ID n°: 112 (subrayado) se escinde antes de la secreción del péptido de fusión maduro. La región de cola subrayada C-terminal es el AFP. La parte de pectato liasa madura se muestra en cursiva.

[0290] En la cepa de *Bacillus subtilis* PP1331-2 el gen de pectato liasa se funde en marco a la secuencia de ADN que codifica un conector más grande (una extensión de aminoácidos cargados negativamente) y novispirina G10. La proteína de fusión segregada de PP1331-2 (aminoácidos 1-392 de SEC ID n°: 115) fue identificada como una banda del tamaño correcto (43 kDal) ejecutando el caldo de cultivo en un gel SDS PAGE:

MKQQKRLYARLLTLLFALIFLLPHSAAAAASALNSGKVNPLADFSLKGFALNGGTTGG
EGGQTVTVTTGDQLIAALKNKNANTPLKIYVNGTITTSNTSASKIDVKDVSNSVIVGSGTKGELK
GIGIKIWRANNIIIRNLKIHEVASGDKDAIGIEGPSKNIWVDHNELYHSLNVDKDYDGLFDVKRD
AEYITFSWNYVHDGWKSMLMGSSSDSNYNRTITFHNNWFENLNSRVSSFRFGEGHIYNNYF
NKIIDSGINSRMGARIRIENNLFENAKDPIVSWYSSSPGYWHVSNKFNNSRGSMPPTTSTTTY
NPPYSYSLDNVDNVKSIVKQAGVGKINPASLDKREAEEACEEERNAEEERRDEPDERDAQVE
HNAREAEADAEAVGPEAFADLDPWEKNLRRIRKGIHIKKYG (SEQ ID NO: 115).

[0291] La parte de péptido señal N-terminal (subrayado) de la SEC ID n°: 115 se escinde antes de la secreción del péptido de fusión maduro. La región de cola subrayada C-terminal es la novispirina G10. La parte de pectato liasa madura se muestra en cursiva. El fragmento de ADN correspondiente a la SEC ID n°: 115 es el PP1331-2 Sac1 Mlu1 fragmento de ADN de la SEC ID n°: 114. La parte de pectato liasa madura se muestra en cursiva. El fragmento de ADN correspondiente a la SEC ID n°: 115 es el PP1331-2 Sac1 Mlu1 fragmento de ADN de la SEC ID n°: 114.

LISTA DE SECUENCIAS

[0292]

<110> Novozymes A/S

<120> Producción Recombinante de Agentes Antimicrobianos

<130> 10486

<160> 118

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1
 <211> 20
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Péptido

 10 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(20)

 <220>
 15 <221> DISULFID
 <222> (2)..(19)

 Lys Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala Pro Ser
 1 5 10 15

 Ile Thr Cys Val
 20
 <400> 1

 20 <210> 2
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

 25 <220>
 <223> Péptido

 <220>
 <221> FUNCIÓN MISCELÁNEA
 30 <223> El grupo tiol de Cys en la posición 2 está bloqueado

 <220>
 <221> FUNCIÓN MISCELÁNEA
 <223> El grupo tiol de Cys en la posición 19 está bloqueado

 35 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(20)

<400> 2

Lys Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala Pro Ser
 1 5 10 15
 Ile Thr Cys Val
 20

5

<210> 3
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Péptido

15

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(20)

20

<220>
 <221> DISULFID
 <222> (2)..(19)

<400> 3

Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro
 1 5 10 15
 Val Ser Cys Ile
 20

25

<210> 4
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> Péptido
 <220>
 <221> FUNCIÓN MISCELÁNEA

<223> El grupo tiol de Cys en la posición 2 está bloqueado

<220>

<221> FUNCIÓN MISCELÁNEA

5 <223> El grupo tiol de Cys en la posición 19 está bloqueado

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(20)

10

<400> 4

Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro
1 5 10 15

Val Ser Cys Ile
20

15 <210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Péptido

<220>

<221> PÉPTIDO

25 <222> (1)..(5)

<400> 5

Arg Trp Gln Trp Arg
1 5

30 <210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

35 <223> Péptido

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(5)

5 <400> 6

Arg Arg Gln Trp Arg
1 5

<210> 7
<211> 5
<212> PRT
10 <213> Artificial

<220>
<223> Péptido

15 <220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(5)

<400> 7

Lys Val Ser Trp Arg
1 5

20 <210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> Péptido

30 <220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(5)

<400> 8

Arg Asn Met Arg Lys
1 5

35 <210> 9
<211> 5
<212> PRT

<213> Artificial

<220>
<223> Péptido

5

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(5)

10

<400> 9

<210> 10
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

15

<220>
<223> Péptido

20

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(6)

<400> 10

25

<210> 11
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

30

<220>
<223> Péptido

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(6)

35

<400> 11

Arg Trp Gln Glu Lys
1 5

Arg Arg Trp Gln Trp Arg
1 5

Arg Arg Arg Gln Trp Arg
1 5

5 <210> 12
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido

10 <220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(6)

<400> 12

Lys Thr Val Ser Trp Arg
1 5

15 <210> 13
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Péptido

25 <220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(6)

<400> 13

Lys Arg Asn Met Arg Lys
1 5

30 <210> 14
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> Péptido

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(6)

5 <400> 14

Arg Trp Gln Glu Met Lys
1 5

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Péptido

15 <220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1) .. (11)

<400> 15

Lys Thr Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys
1 5 10

20 <210> 16

<211> 11

<212> PRT

25 <213> Artificial

<220>

<223> Péptido

<220>

<221> PÉPTIDO

30 <222> (1) .. (11)

<400> 16

Lys Ser Arg Arg Arg Gln Trp Arg Met Lys Lys
1 5 10

<210> 17

35 <211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido

5

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(11)

<400> 17

Lys Thr Val Ser Trp Gln Thr Tyr Met Lys Lys
1 5 10

10

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> Péptido

<220>

20

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(11)

<400> 18

Lys Thr Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys
1 5 10

25

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> Sintético

30

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(11)

<400> 19

Lys Thr Leu Arg Trp Gln Asn Glu Met Arg Lys
1 5 10

35

<210> 20

<211> 6

<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> Péptido

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(6)

10 <400> 20

Phe Gln Trp Gln Arg Asn
1 5

<210> 21
<211> 5
15 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido

20 <220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(5)

25 <400> 21

Phe Gln Trp Gln Arg
1 5

<210> 22
<211> 4
30 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido

35 <220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(4)

<400> 22

Gln Trp Gln Arg
1

5 <210> 23
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido
<220>
10 <221> PÉPTIDO
<222> (1)..(3)

<400> 23

Trp Gln Arg
1

15 <210> 24
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Péptido

<220>
<221> PÉPTIDO
25 <222> (1)..(5)

<400> 24

Arg Arg Trp Gln Trp
1 5

30 <210> 25
<211> 4
<212> PRT
<213> Sintético

<220>
35 <221> PÉPTIDO
<222> (1)..(4)

<400> 25

Arg Arg Trp Gln
1

<210> 26

<211> 4

5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido

10

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(4)

15

<400> 26

Trp Gln Trp Arg
1

<210> 27

<211> 3

<212> PRT

20

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido

25

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(3)

<400> 27

Gln Trp Arg
1

30

<210> 28

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

35

<220>

<223> Péptido

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(3)
5
<400> 28
Leu Arg Trp Gln Asn Asp
1 5
<210> 29
<211> 5
10 <212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Péptido
15
<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(5)
20 <400> 29
Leu Arg Trp Gln Asn
1 5
<210> 30
<211> 4
<212> PRT
25 <213> Artificial
<220>
<223> Péptido
30
<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(4)
<400> 30
Leu Arg Trp Gln
1
35
<210> 31
<211> 3

<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> Péptido

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(3)

10 <400> 31

Arg Trp Gln
1

<210> 32
<211> 25
15 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido

20 <220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(25)

25 <400>32

Phe Lys Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala Pro
1 5 10 15

Ser Ile Thr Cys Val Arg Arg Ala Phe
20 25

30 <210> 33
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
35 <223> Péptido

- <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(11)
- 5 <220>
 <221> función miscelánea
 <222> (2)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
- 10 <220>
 <221> función miscelánea
 <222> (7)..(8)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
- 15 <400> 33
- Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Xaa Xaa Met Lys Lys**
1 5 10
- <210> 34
 <211> 11
 <212> PRT
- 20 <213> Artificial
- <220>
 <223> Péptido
- 25 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(11)
- <220>
- 30 <221> función miscelánea
 <222> (2)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
- <220>
- 35 <221> función miscelánea
 <222> (7)..(8)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
- <400> 34

ES 2 368 221 T3

Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Xaa Xaa Met Arg Lys
1 5 10

- <210> 35
<211> 6
<212> PRT
5 <213> Artificial
- <220>
<223> Péptido
- 10 <220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(6)
- <220>
15 <221> función miscelánea
<222> (2)..(5)
<223> xaa puede ser cualquier aminoácido
- <400> 35
- Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Arg
1 5
- 20 <210> 36
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial
- 25 <220>
<223> Péptido
- <220>
30 <221> PÉPTIDO
<222> (1)..(6)
- <220>
<221> función miscelánea
35 <222> (2)..(5)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
- <400> 36

Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Arg
 1 5

5 <210> 37
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido
 10 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(6)
 <220>
 15 <221> función miscelánea
 <222> (2)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Lys
 1 5

<400> 37
 20 <210> 38
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> Péptido
 <220>
 30 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(6)
 <220>
 <221> función miscelánea
 35 <222> (2)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural
 <400> 38

Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Lys
1 5

5 <210> 39
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido

10 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(5)

15 <220>
 <221> función miscelánea
 <222> (2)..(4)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 39

Arg Xaa Xaa Xaa Arg
1 5

20 <210> 40
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Sintético

25 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(5)

30 <220>
 <221> función miscelánea
 <222> (2)..(4)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 40

Lys Xaa Xaa Xaa Arg
1 5

35 <210> 41
 <211> 5

<212> PRT
<213> Sintético

5 <220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(5)

10 <220>
<221> función miscelánea
<222> (2)..(4)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 41

Arg Xaa Xaa Xaa Lys
1 5

15 <210> 42
<211> 38
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Péptido
<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(38)

25 <400>42

Lys Asn Val Arg Trp Cys Thr Ile Ser Gln Pro Glu Trp Phe Lys Cys
1 5 10 15

Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala Pro Ser Ile Thr
20 25 30

Cys Val Arg Arg Ala Phe
35

30 <210> 43
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Péptido

<220>

<221> PÉPTIDO

5

<222> (1)..(32)

<400>43

Thr Ile Ser Gln Pro Glu Trp Phe Lys Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg
 1 5 10 15

Met Lys Lys Leu Gly Ala Pro Ser Ile Thr Cys Val Arg Arg Ala Phe
 20 25 30

10

<210> 44

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> Péptido

<220>

<221> PÉPTIDO

20

<222> (1)..(36)

<400> 44

Val Ser Gln Pro Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met
 1 5 10 15

Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg Asp Ser Pro
 20 25 30

Ile Gln Cys Ile

25

<210> 45

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

30

<220>

<223> Péptido

5
 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(5)

<220>
 <221> función miscelánea
 <222> (2)..(4)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

10
 <400> 45

Lys Xaa Xaa Xaa Lys
 1 5

<210> 46
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

20
 <220>
 <223> Péptido

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(11)

25
 <400> 46

Gly Arg Arg Arg Arg Ser Val Gln Trp Cys Ala
 1 5 10

<210> 47
 <211> 50
 <212> PRT
 <213> Artificial

35
 <220>
 <223> Péptido
 <220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(50)

<400>47

Ala Pro Arg Lys Asn Val Arg Trp Cys Thr Ile Ser Gln Pro Glu Trp
1 5 10 15

Phe Lys Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala Pro
20 25 30

Ser Ile Thr Cys Val Arg Arg Ala Phe Ala Leu Glu Cys Ile Arg Ala
35 40 45

Ile Ala
50

5 <210> 48
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Péptido

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(18)

15 <400> 48

Pro Glu Trp Phe Lys Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu
1 5 10 15

Gly Ala

20 <210> 49
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> Péptido

<220>
<221> PÉPTIDO
30 <222> (1)..(15)

<400> 49

Phe Lys Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala
1 5 10 15

<210> 50

5

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10

<223> Péptido

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(14)

15

<400> 50

Lys Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala
1 5 10

<210> 51

<211> 13

20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido

25

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(13)

30

<400> 51

Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala
1 5 10

<210> 52

<211> 12

<212> PRT

35

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido

<220>

<221> PÉPTIDO

5

<222> (1)..(12)

<400> 52

Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala
1 5 10

<210> 53

10

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15

<223> Péptido

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(15)

20

<400> 53

Lys Lys Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala
1 5 10 15

<210> 54

25

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido

30

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(15)

<400> 54

Phe Lys Cys Phe Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala
1 5 10 15

35

<210> 55

<211> 15

<212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 5 <223> Péptido

<220>
 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(15)

10 <400> 55

Lys Lys Cys Phe Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala
 1 5 10 15

<210> 56
 <211> 14

15 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido <220>

20 <221> PÉPTIDO
 <222> (1)..(14)

<400> 56

Phe Lys Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly
 1 5 10

25 <210> 57
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Péptido

<220>
 <221> PÉPTIDO

35 <222> (1)..(19)

<400> 57

Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala Pro Ser Ile
1 5 10 15

Thr Cys Val

5 <210> 58
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Péptido

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(6)

15 <400> 58

Arg Arg Trp Gln Trp Arg
1 5

20 <210> 59
<211> 188
<212> PRT
<213> especie Nocardiosis

25 <220>
<221> péptido mat
<222> (1)..(188)

<400> 59

Ala Asp Ile Ile Gly Gly Leu Ala Tyr Thr Met Gly Gly Arg Cys Ser
 1 5 10 15
 Val Gly Phe Ala Ala Thr Asn Ala Ala Gly Gln Pro Gly Phe Val Thr
 20 25 30
 Ala Gly His Cys Gly Arg Val Gly Thr Gln Val Thr Ile Gly Asn Gly
 35 40 45
 Arg Gly Val Phe Glu Gln Ser Val Phe Pro Gly Asn Asp Ala Ala Phe
 50 55 60
 Val Arg Gly Thr Ser Asn Phe Thr Leu Thr Asn Leu Val Ser Arg Tyr
 65 70 75 80
 Asn Thr Gly Gly Tyr Ala Ala Val Ala Gly His Asn Gln Ala Pro Ile
 85 90 95
 Gly Ser Ser Val Cys Arg Ser Gly Ser Thr Thr Gly Trp His Cys Gly
 100 105 110
 Thr Ile Gln Ala Arg Gly Gln Ser Val Ser Tyr Pro Glu Gly Thr Val
 115 120 125
 Thr Asn Met Thr Arg Thr Thr Val Cys Ala Glu Pro Gly Asp Ser Gly
 130 135 140
 Gly Ser Tyr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Gln Gly Val Thr Ser Gly Gly
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Cys Arg Thr Gly Gly Thr Thr Phe Tyr Gln Glu Val Thr
 165 170 175
 Pro Met Val Asn Ser Trp Gly Val Arg Leu Arg Thr
 180 185

<210> 60

5 <211> 354

<212> PRT

<213> Nocardiosis dassonvillei subesp. dassonvillei

<220>

10 <221> péptido mat

<222> (167)..(354)

<400> 60

Ala Pro Ala Pro Val Pro Gln Thr Pro Val Ala Asp Asp Ser Ala
 -165 -160 -155

Ala Ser Met Thr Glu Ala Leu Lys Arg Asp Leu Asp Leu Thr Ser
 -150 -145 -140

Ala Glu Ala Glu Glu Leu Leu Ser Ala Gln Glu Ala Ala Ile Glu
 -135 -130 -125

Thr Asp Ala Glu Ala Thr Glu Ala Ala Gly Glu Ala Tyr Gly Gly
 -120 -115 -110

Ser Leu Phe Asp Thr Glu Thr Leu Glu Leu Thr Val Leu Val Thr Asp
 -105 -100 -95

Ala Ser Ala Val Glu Ala Val Glu Ala Thr Gly Ala Gln Ala Thr Val
 -90 -85 -80 -75

Val Ser His Gly Thr Glu Gly Leu Thr Glu Val Val Glu Asp Leu Asn
 -70 -65 -60

Gly Ala Glu Val Pro Glu Ser Val Leu Gly Trp Tyr Pro Asp Val Glu
 -55 -50 -45

Ser Asp Thr Val Val Val Glu Val Leu Glu Gly Ser Asp Ala Asp Val
 -40 -35 -30

Ala Ala Leu Leu Ala Asp Ala Gly Val Asp Ser Ser Ser Val Arg Val
 -25 -20 -15

Glu Glu Ala Glu Glu Ala Pro Gln Val Tyr Ala Asp Ile Ile Gly Gly
 -10 -5 -1 1 5

Leu Ala Tyr Tyr Met Gly Gly Arg Cys Ser Val Gly Phe Ala Ala Thr
 10 15 20
 Asn Ser Ala Gly Gln Pro Gly Phe Val Thr Ala Gly His Cys Gly Thr
 25 30 35
 Val Gly Thr Gly Val Thr Ile Gly Asn Gly Thr Gly Thr Phe Gln Asn
 40 45 50
 Ser Val Phe Pro Gly Asn Asp Ala Ala Phe Val Arg Gly Thr Ser Asn
 55 60 65 70
 Phe Thr Leu Thr Asn Leu Val Ser Arg Tyr Asn Ser Gly Gly Tyr Gln
 75 80 85
 Ser Val Thr Gly Thr Ser Gln Ala Pro Ala Gly Ser Ala Val Cys Arg
 90 95 100
 Ser Gly Ser Thr Thr Gly Trp His Cys Gly Thr Ile Gln Ala Arg Asn
 105 110 115
 Gln Thr Val Arg Tyr Pro Gln Gly Thr Val Tyr Ser Leu Thr Arg Thr
 120 125 130
 Asn Val Cys Ala Glu Pro Gly Asp Ser Gly Gly Ser Phe Ile Ser Gly
 135 140 145 150
 Ser Gln Ala Gln Gly Val Thr Ser Gly Gly Ser Gly Asn Cys Ser Val
 155 160 165
 Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Gln Glu Val Thr Pro Met Ile Asn Ser Trp
 170 175 180
 Gly Val Arg Ile Arg Thr
 185

<210> 61

<211> 355

5 <212> PRT

<213> Nocardiosis alba

<220>

<221> péptido mat

10 <222> (168)..(355)

<400> 61

ES 2 368 221 T3

Ala Thr Gly Pro Leu Pro Gln Ser Pro Thr Pro Asp Glu Ala Glu
-165 -160 -155

Ala Thr Thr Met Val Glu Ala Leu Gln Arg Asp Leu Gly Leu Ser
-150 -145 -140

Pro Ser Gln Ala Asp Glu Leu Leu Glu Ala Gln Ala Glu Ser Phe
 -135 -130 -125
 Glu Ile Asp Glu Ala Ala Thr Ala Ala Ala Ala Asp Ser Tyr Gly
 -120 -115 -110
 Gly Ser Ile Phe Asp Thr Asp Ser Leu Thr Leu Thr Val Leu Val Thr
 -105 -100 -95
 Asp Ala Ser Ala Val Glu Ala Val Glu Ala Ala Gly Ala Glu Ala Lys
 -90 -85 -80
 Val Val Ser His Gly Met Glu Gly Leu Glu Glu Ile Val Ala Asp Leu
 -75 -70 -65 -60
 Asn Ala Ala Asp Ala Gln Pro Gly Val Val Gly Trp Tyr Pro Asp Ile
 -55 -50 -45
 His Ser Asp Thr Val Val Leu Glu Val Leu Glu Gly Ser Gly Ala Asp
 -40 -35 -30
 Val Asp Ser Leu Leu Ala Asp Ala Gly Val Asp Thr Ala Asp Val Lys
 -25 -20 -15
 Val Glu Ser Thr Thr Glu Gln Pro Glu Leu Tyr Ala Asp Ile Ile Gly
 -10 -5 -1 1 5
 Gly Leu Ala Tyr Thr Met Gly Gly Arg Cys Ser Val Gly Phe Ala Ala
 10 15 20
 Thr Asn Ala Ser Gly Gln Pro Gly Phe Val Thr Ala Gly His Cys Gly
 25 30 35
 Thr Val Gly Thr Pro Val Ser Ile Gly Asn Gly Gln Gly Val Phe Glu
 40 45 50
 Arg Ser Val Phe Pro Gly Asn Asp Ser Ala Phe Val Arg Gly Thr Ser
 55 60 65
 Asn Phe Thr Leu Thr Asn Leu Val Ser Arg Tyr Asn Thr Gly Gly Tyr
 70 75 80 85
 Ala Thr Val Ser Gly Ser Ser Gln Ala Ala Ile Gly Ser Gln Ile Cys
 90 95 100
 Arg Ser Gly Ser Thr Thr Gly Trp His Cys Gly Thr Val Gln Ala Arg
 105 110 115
 Gly Gln Thr Val Ser Tyr Pro Gln Gly Thr Val Gln Asn Leu Thr Arg
 120 125 130

ES 2 368 221 T3

Thr Asn Val Cys Ala Glu Pro Gly Asp Ser Gly Gly Ser Phe Ile Ser
135 140 145
Gly Ser Gln Ala Gln Gly Val Thr Ser Gly Gly Ser Gly Asn Cys Ser
150 155 160
Phe Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Gln Glu Val Asn Pro Met Leu Ser Ser
170 175 180
Trp Gly Leu Thr Leu Arg Thr
185

<210> 62

<211> 353

5

<212> PRT

<213> Nocardiosis prasina

<220>

<221> péptido mat

10

<222> (166)..(353)

<400>62

Ala Thr Gly Pro Leu Pro Gln Ser Pro Thr Pro Glu Ala Asp Ala
 -165 -160 -155

Val Ser Met Gln Glu Ala Leu Gln Arg Asp Leu Gly Leu Thr Pro
 -150 -145 -140

Leu Glu Ala Asp Glu Leu Leu Ala Ala Gln Asp Thr Ala Phe Glu
 -135 -130 -125

Val Asp Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Asp Ala Tyr Gly Gly
 -120 -115 -110

Ser Val Phe Asp Thr Glu Thr Leu Glu Leu Thr Val Leu Val Thr Asp
 -105 -100 -95 -90

Ala Ala Ser Val Glu Ala Val Glu Ala Thr Gly Ala Gly Thr Glu Leu
 -85 -80 -75

Val Ser Tyr Gly Ile Glu Gly Leu Asp Glu Ile Ile Gln Asp Leu Asn
 -70 -65 -60

Ala Ala Asp Ala Val Pro Gly Val Val Gly Trp Tyr Pro Asp Val Ala
 -55 -50 -45

Gly Asp Thr Val Val Leu Glu Val Leu Glu Gly Ser Gly Ala Asp Val
 -40 -35 -30

Ser Gly Leu Leu Ala Asp Ala Gly Val Asp Ala Ser Ala Val Glu Val
 -25 -20 -15 -10

Thr Ser Ser Ala Gln Pro Glu Leu Tyr Ala Asp Ile Ile Gly Gly Leu
 -5 -1 1 5
 Ala Tyr Thr Met Gly Gly Arg Cys Ser Val Gly Phe Ala Ala Thr Asn
 10 15 20
 Ala Ala Gly Gln Pro Gly Phe Val Thr Ala Gly His Cys Gly Arg Val
 25 30 35
 Gly Thr Gln Val Ser Ile Gly Asn Gly Gln Gly Val Phe Glu Gln Ser
 40 45 50 55
 Ile Phe Pro Gly Asn Asp Ala Ala Phe Val Arg Gly Thr Ser Asn Phe
 60 65 70
 Thr Leu Thr Asn Leu Val Ser Arg Tyr Asn Thr Gly Gly Tyr Ala Thr
 75 80 85
 Val Ala Gly His Asn Gln Ala Pro Ile Gly Ser Ser Val Cys Arg Ser
 90 95 100
 Gly Ser Thr Thr Gly Trp His Cys Gly Thr Ile Gln Ala Arg Gly Gln
 105 110 115
 Ser Val Ser Tyr Pro Glu Gly Thr Val Thr Asn Met Thr Arg Thr Thr
 120 125 130 135
 Val Cys Ala Glu Pro Gly Asp Ser Gly Gly Ser Tyr Ile Ser Gly Asn
 140 145 150
 Gln Ala Gln Gly Val Thr Ser Gly Gly Ser Gly Asn Cys Arg Thr Gly
 155 160 165
 Gly Thr Thr Phe Tyr Gln Glu Val Thr Pro Met Val Asn Ser Trp Gly
 170 175 180
 Val Arg Leu Arg Thr
 185

<210> 63

<211> 353

5 <212> PRT

<213> Nocardiosis prasina

<220>

<221> péptido mat

10 <222> (166)..(353)

<400> 63

Ala Thr Gly Pro Leu Pro Gln Ser Pro Thr Pro Glu Ala Asp Ala
-165 -160 -155

Val Ser Met Gln Glu Ala Leu Gln Arg Asp Leu Gly Leu Thr Pro
 -150 -145 -140
 Leu Glu Ala Asp Glu Leu Leu Ala Ala Gln Asp Thr Ala Phe Glu
 -135 -130 -125
 Val Asp Glu Ala Ala Ala Glu Ala Ala Gly Asp Ala Tyr Gly Gly
 -120 -115 -110
 Ser Val Phe Asp Thr Glu Thr Leu Glu Leu Thr Val Leu Val Thr Asp
 -105 -100 -95 -90
 Ser Ala Ala Val Glu Ala Val Glu Ala Thr Gly Ala Gly Thr Glu Leu
 -85 -80 -75
 Val Ser Tyr Gly Ile Thr Gly Leu Asp Glu Ile Val Glu Glu Leu Asn
 -70 -65 -60
 Ala Ala Asp Ala Val Pro Gly Val Val Gly Trp Tyr Pro Asp Val Ala
 -55 -50 -45
 Gly Asp Thr Val Val Leu Glu Val Leu Glu Gly Ser Gly Ala Asp Val
 -40 -35 -30
 Gly Gly Leu Leu Ala Asp Ala Gly Val Asp Ala Ser Ala Val Glu Val
 -25 -20 -15 -10
 Thr Thr Thr Glu Gln Pro Glu Leu Tyr Ala Asp Ile Ile Gly Gly Leu
 -5 -1 1 5
 Ala Tyr Thr Met Gly Gly Arg Cys Ser Val Gly Phe Ala Ala Thr Asn
 10 15 20
 Ala Ala Gly Gln Pro Gly Phe Val Thr Ala Gly His Cys Gly Arg Val
 25 30 35
 Gly Thr Gln Val Thr Ile Gly Asn Gly Arg Gly Val Phe Glu Gln Ser
 40 45 50 55
 Ile Phe Pro Gly Asn Asp Ala Ala Phe Val Arg Gly Thr Ser Asn Phe
 60 65 70
 Thr Leu Thr Asn Leu Val Ser Arg Tyr Asn Thr Gly Gly Tyr Ala Thr
 75 80 85
 Val Ala Gly His Asn Gln Ala Pro Ile Gly Ser Ser Val Cys Arg Ser
 90 95 100
 Gly Ser Thr Thr Gly Trp His Cys Gly Thr Ile Gln Ala Arg Gly Gln
 105 110 115

Ser Val Ser Tyr Pro Glu Gly Thr Val Thr Asn Met Thr Arg Thr Thr
 120 125 130 135
 Val Cys Ala Glu Pro Gly Asp Ser Gly Gly Ser Tyr Ile Ser Gly Asn
 140 145 150
 Gln Ala Gln Gly Val Thr Ser Gly Gly Ser Gly Asn Cys Arg Thr Gly
 155 160 165
 Gly Thr Thr Phe Tyr Gln Glu Val Thr Pro Met Val Asn Ser Trp Gly
 170 175 180
 Val Arg Leu Arg Thr
 185

<210> 64

<211> 439

5 <212> PRT

<213> Peniophora lycii

<220>

<221> péptido mat

10 <222> (31)..(439)

<400> 64

ES 2 368 221 T3

Met Val Ser Ser Ala Phe Ala Pro Ser Ile Leu Leu Ser Leu Met Ser
 -30 -25 -20 -15

Ser Leu Ala Leu Ser Thr Gln Phe Ser Phe Val Ala Ala Gln Leu Pro
 -10 -5 -1 1

Ile Pro Ala Gln Asn Thr Ser Asn Trp Gly Pro Tyr Asp Pro Phe Phe
 5 10 15

Pro Val Glu Pro Tyr Ala Ala Pro Pro Glu Gly Cys Thr Val Thr Gln
 20 25 30

Val Asn Leu Ile Gln Arg His Gly Ala Arg Trp Pro Thr Ser Gly Ala
 35 40 45 50

Arg Ser Arg Gln Val Ala Ala Val Ala Lys Ile Gln Met Ala Arg Pro
 55 60 65

Phe Thr Asp Pro Lys Tyr Glu Phe Leu Asn Asp Phe Val Tyr Lys Phe
 70 75 80

Gly Val Ala Asp Leu Leu Pro Phe Gly Ala Asn Gln Ser His Gln Thr
 85 90 95

Gly Thr Asp Met Tyr Thr Arg Tyr Ser Thr Leu Phe Glu Gly Gly Asp
 100 105 110

Val Pro Phe Val Arg Ala Ala Gly Asp Gln Arg Val Val Asp Ser Ser
 115 120 125 130
 Thr Asn Trp Thr Ala Gly Phe Gly Asp Ala Ser Gly Glu Thr Val Leu
 135 140 145
 Pro Thr Leu Gln Val Val Leu Gln Glu Gly Asn Cys Thr Leu Cys
 150 160
 Asn Asn Met Cys Pro Asn Glu Val Asp Gly Asp Glu Ser Thr Thr Trp
 165 170 175
 Leu Gly Val Phe Ala Pro Asn Ile Thr Ala Arg Leu Asn Ala Ala Ala
 180 185 190
 Pro Ser Ala Asn Leu Ser Asp Ser Asp Ala Leu Thr Leu Met Asp Met
 195 200 205 210
 Cys Pro Phe Asp Thr Leu Ser Ser Gly Asn Ala Ser Pro Phe Cys Asp
 215 220 225
 Leu Phe Thr Ala Glu Glu Tyr Val Ser Tyr Glu Tyr Tyr Tyr Asp Leu
 230 235 240
 Asp Lys Tyr Tyr Gly Thr Gly Pro Gly Asn Ala Leu Gly Pro Val Gln
 245 250 255
 Gly Val Gly Tyr Val Asn Glu Leu Leu Ala Arg Leu Thr Gly Gln Ala
 260 265 270
 Val Arg Asp Glu Thr Gln Thr Asn Arg Thr Leu Asp Ser Asp Pro Ala
 275 280 285 290
 Thr Phe Pro Leu Asn Arg Thr Phe Tyr Ala Asp Phe Ser His Asp Asn
 295 300 305
 Thr Met Val Pro Ile Phe Ala Ala Leu Gly Leu Phe Asn Ala Thr Ala
 310 315 320
 Leu Asp Pro Leu Lys Pro Asp Glu Asn Arg Leu Trp Val Asp Ser Lys
 325 330 335
 Leu Val Pro Phe Ser Gly His Met Thr Val Glu Lys Leu Ala Cys Ser
 340 345 350
 Gly Lys Glu Ala Val Arg Val Leu Val Asn Asp Ala Val Gln Pro Leu
 355 360 365 370
 Glu Phe Cys Gly Gly Val Asp Gly Val Cys Glu Leu Ser Ala Phe Val
 375 380 385

Glu Ser Gln Thr Tyr Ala Arg Glu Asn Gly Gln Gly Asp Phe Ala Lys
390 395 400

Cys Gly Phe Val Pro Ser Glu
405

5 <210> 65
<211> 39
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Péptido

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(39)

15 <400> 65

Arg Arg Arg Pro Arg Pro Pro Tyr Leu Pro Arg Pro Arg Pro Pro Pro
1 5 10 15

Phe Phe Pro Pro Arg Leu Pro Pro Arg Ile Pro Pro Gly Phe Pro Pro
20 25 30

Arg Phe Pro Pro Arg Phe Pro
35

20 <210> 66
<211> 44
<212> ADN
<213> Artificial

25 <220>
<223> Cebador

<220>
<221> función miscelánea
<223> Cebador

30 <400> 66
catagcacca tggaaaggag acgtccccga ccccatatt tgcc 44

ES 2 368 221 T3

<210> 67
<211> 47
<212> ADN
5 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador

10 <220>
<221> función miscelánea
<223> Cebador

<400> 67
15 catagcacca tggatgaaag gagacgtccc cgaccccat atttgcc 47

<210> 68
<211> 50
<212> ADN
20 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador

25 <220>
<221> función miscelánea
<223> Cebador

<400> 68
30 catagcacca tggacgatga aaggagacgt ccccgacccc catatttgcc 50

<210> 69
<211> 53
<212> ADN
35 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador

40 <220>
<221> función miscelánea

ES 2 368 221 T3

<223> Cebador

<400> 69
catagcacca tggatgacga tgaaaggaga cgtccccgac ccccatatt gcc 53

5

<210> 70
<211> 56
<212> ADN
<213> Artificial

10

<220>
<223> Cebador

<220>
<221> función miscelánea
<223> Cebador

15

<400> 70
catagcacca tggacgatga cgatgaaagg agacgtcccc gacccccata ttgcc 56

20

<210> 71
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

25

<220>
<223> Cebador

<220>
<221> función miscelánea
<223> Cebador

30

<400> 71
ccataagatt agcggatcct acc 23

35

<210> 72
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

40

<220>

<223> Cebador

<220>

<221> función miscelánea

5

<223> Cebador

<400> 72

ctctcatccg ccaaaacagc c 21

10

<210> 73

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> Péptido

<220> PÉPTIDO

<221> PÉPTIDO

20

<222> (1)..(18)

<400> 73

Lys Asn Leu Arg Arg Ile Ile Arg Lys Gly Ile His Ile Ile Lys Lys
1 5 10 15

Tyr Gly

25

<210> 74

<211> 51

<212> ADN

<213> Artificial

30

<220>

<223> Cebador

<220>

<221> función miscelánea

35

<223> Cebador

<400> 74

aggggtatcg atggctaaga gagaagccga aaggagacgt ccccgacccc c 51

ES 2 368 221 T3

<210> 75
<211> 54
<212> ADN
5 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador

10 <220>
<221> función miscelánea
<223> Cebador

<400> 75
15 aggggtatcg atggctaaga gagaagccga tgaaaggaga cgtccccgac cccc 54

<210> 76
<211> 57
<212> ADN
20 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador

25 <220>
<221> función miscelánea
<223> Cebador

<400> 76
30 aggggtatcg atggctaaga gagaagccga cgatgaaagg agacgtcccc gaccccc 57

<210> 77
<211> 60
<212> ADN
35 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador

40 <220>
<221> función miscelánea

<223> Cebador

<400> 77

aggggtatcg atggctaaga gagaagccga tgacgatgaa aggagacgtc cccgaccccc 60

5

<210> 78

<211> 63

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> Cebador

<220>

15

<221> función miscelánea

<223> Cebador

<400> 78

aggggtatcg atggctaaga gagaagccga cgatgacgat gaaaggagac gtccccgacc 60

ccc 63

20

<210> 79

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> Péptido

<220>

<221> FUNCIÓN MISCELÁNEA

30

<223> Conector

<400> 79

**Pro Glu Pro Thr
1**

35

<210> 80

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido

<220>

5

<221> FUNCIÓN MISCELÁNEA

<223> Conector

<400> 80

**Glu Pro Thr Pro
1**

10

<210> 81

<211> 4

<212> PRT

<213> artificial

15

<220>

<223> Péptido

<220>

<221> FUNCIÓN MISCELÁNEA

20

<223> Conector

<400> 81

**Pro Thr Glu Pro
1**

25

<210> 82

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

30

<223> Péptido

<220>

<221> FUNCIÓN MISCELÁNEA

<223> Conector

35

<400> 82

**Thr Pro Glu Pro
1**

<210> 83
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial
5
<220>
<223> Péptido

<220>
10 <221> FUNCIÓN MISCELÁNEA
<223> conector

<400> 83

Ile Glu Gly Arg
1

15 <210> 84
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Péptido

<220>
<221> FUNCIÓN MISCELÁNEA
25 <223> Extensión

<400> 84

Gln Ser His Val Gln Ser Ala Pro
1 5

30 <210> 85
<211> 4
<212> PRT
<213> artificial

<220>
35 <223> Péptido

<220>
<221> FUNCIÓN MISCELÁNEA

<223> Extensión

<400> 85

Gln Ser Ala Pro
1

5 <210> 86
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Péptido

<220>
<221> FUNCIÓN MISCELÁNEA
15 <223> conector de escisión

<220>
<221> función miscelánea
<222> (1)..(1)
20 <223> xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
25 <223> xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 86

Xaa Asp Asp Asp Lys Xaa
1 5

30 <210> 87
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> Péptido

<220>
<221> FUNCIÓN MISCELÁNEA

<223> Conector de escisión

<220>

<221> función miscelánea

5

<222> (1)..(1)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>

<221> función miscelánea

10

<222> (4)..(4)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 87

Xaa Lys Arg Xaa
1

15

<210> 88

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> Péptido

<220>

<221> FUNCIÓN MISCELÁNEA

25

<223> conector de escisión

<220>

<221> función miscelánea

<222> (1)..(1)

30

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>

<221> función miscelánea

<222> (6)..(6)

35

<223> xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 88

Xaa Ile Glu Gly Arg Xaa
1 5

<210> 89

<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> Péptido

<220>
<221> FUNCIÓN MISCELÁNEA
10 <223> conector de escisión

<220>
<221> función miscelánea
<222> (2)..(2)
15 <223> xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>
<221> función miscelánea
<222> (5)..(6)
20 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 89

Pro Xaa Gly Pro Xaa Xaa
1 5

25 <210> 90
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> Péptido

<220>
<221> FUNCIÓN MISCELÁNEA
<223> conector de escisión
35

<220>
<221> función miscelánea
<222> (1)..(1)
40 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>

<221> función miscelánea

<222> (8)..(8)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

5

<400> 90

Xaa Gly Val Arg Gly Pro Arg Xaa
1 5

<210> 91

<211> 4

10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido

15

<220>

<221> FUNCIÓN MISCELÁNEA

<223> Conector de escisión

20

<220>

<221> función miscelánea

<222> (4)..(4)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

25

<400> 91

Ser Asn Gly Xaa
1

<210> 92

<211> 5

<212> PRT

30

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido

35

<220>

<221> FUNCIÓN MISCELÁNEA

<223> Péptido de protección

<400> 92

Asp Asp Glu Glu Glu
1 5

5 <210> 93
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido

10 <220>
<221> FUNCIÓN MISCELÁNEA
<223> Péptido de protección

<400> 93

Asp Asp Asp Glu Glu
1 5

15 <210> 94
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Péptido

25 <220>
<221> FUNCIÓN MISCELÁNEA
<223> Péptido de protección

<400> 94

Asp Asp Asp Asp Glu
1 5

30 <210> 95
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> Péptido
<220>

<221> FUNCIÓN MISCELÁNEA

<223> Péptido de protección

<400> 95

5

Glu Glu Asp Asp Glu
1 5

<210> 96

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Péptido

<220>

15

<221> FUNCIÓN MISCELÁNEA

<223> Péptido de protección

<400> 96

Asp Asp Glu Glu Asp
1 5

20

<210> 97

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> Péptido

<220>

<221> FUNCIÓN MISCELÁNEA

<223> Péptido de protección

30

<400> 97

Glu Asp Glu Asp Glu
1 5

<210> 98

<211> 6

35

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido

<220>

5

<221> FUNCIÓN MISCELÁNEA

<223> Péptido de protección

<400> 98

Asp Asp Asp Glu Glu Glu
1 5

10

<210> 99

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> Péptido

<220>

20

<221> FUNCIÓN MISCELÁNEA

<223> Péptido de protección

<400> 99

Asp Glu Asp Glu Asp Glu
1 5

25

<210> 100

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

30

<223> Péptido

<220>

35

<221> FUNCIÓN MISCELÁNEA

<223> Péptido de protección

<400> 100

Glu Glu Asp Asp Glu Glu
1 5

<210> 101
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> Péptido

<220>
10 <221> FUNCIÓN MISCELÁNEA
<223> Péptido de protección

<400> 101

Asp Asp Asp Asp Asp Pro
1 5

15 <210> 102
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Péptido

<220>
25 <221> FUNCIÓN MISCELÁNEA
<223> Péptido de protección

<400> 102

Glu Glu Glu Glu Glu Asp Pro
1 5

30 <210> 103
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
35 <223> Péptido

<220>
<221> FUNCIÓN MISCELÁNEA

<223> Péptido de protección

<400> 103

Asp Asp Asp Glu
1

5 <210> 104

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

10 <220>

<223> Péptido

<220>

<221> FUNCIÓN MISCELÁNEA

15 <223> Péptido de protección

<400> 104

Asp Glu Asp Glu Asp Glu Asp Pro
1 5

20 <210> 105

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> Péptido

<220>

<221> FUNCIÓN MISCELÁNEA

<223> Péptido de protección

30 <400> 105

Asp Asp Asp Gly Gly Glu Glu Glu Gly Gly Asp Asp Asp Pro
1 5 10

<210> 106

<211> 14

35 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido

<220>

5

<221> FUNCIÓN MISCELÁNEA

<223> Péptido de protección

<400> 106

Asp Asp Asp Gly Gly Asp Asp Asp Pro Pro Asp Asp Asp Glu
1 5 10

10

<210> 107

<211> 31

<212> ADN

<213> Artificial

15

<220>

<223> Cebador

<400> 107

tatagagctc cattgaaagg ggaggagaat c 31

20

<210> 108

<211> 33

<212> ADN

<213> Artificial

25

<220>

<223> Cebador

<400> 108

30

tatactgcag aatgaggcag caagaagatg agc 33

<210> 109

<211> 33

<212> ADN

35

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

40

<400> 109

tatactgcag ccgcggcagc ttctgcctta aac 33

<210> 110

<211> 32

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Cebador

<400> 110

tatagctagc tggattgatt ttgccgactc cg 32

<210> 111

15 <211> 1227

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

20 <223> Fragmento de ADN (PP1223-9 Sac1 Mlu1)

<220>

<221> CDS

25 <222> (28)..(1218)

<220>

<221> función miscelánea

<222> (115)..(1056)

<223> Pectato lyasa

30

<220>

<221> péptido mat

<222> (115)..()

35

<220>

<221> función miscelánea

<222> (1066)..(1218)

<223> AFP

40

<400> 111

gagctccatt gaaaggggag gagaatc atg aaa caa caa aaa cgg ctt tac gcc	54
Met Lys Gln Gln Lys Arg Leu Tyr Ala	
	-25
cga ttg ctg acg ctg tta ttt gcg ctc atc ttc ttg ctg cct cat tct	102
Arg Leu Leu Thr Leu Leu Phe Ala Leu Ile Phe Leu Leu Pro His Ser	
	-20
	-15
	-10
	-5
gca gcc gcg gca gct tct gcc tta aac tcg ggc aaa gta aat ccg ctt	150
Ala Ala Ala Ala Ala Ser Ala Leu Asn Ser Gly Lys Val Asn Pro Leu	
	-1
	1
	5
	10
gcc gac ttc agc tta aaa ggc ttt gcc gca cta aac ggc gga aca acg	198
Ala Asp Phe Ser Leu Lys Gly Phe Ala Ala Leu Asn Gly Gly Thr Thr	
	15
	20
	25
ggc gga gaa ggc ggt cag acg gta acc gta aca acg gga gat cag ctg	246
Gly Gly Glu Gly Gly Gln Thr Val Thr Val Thr Thr Gly Asp Gln Leu	
	30
	35
	40
att gcg gca tta aaa aat aag aat gca aat acg cct tta aaa att tat	294
Ile Ala Ala Leu Lys Asn Lys Asn Ala Asn Thr Pro Leu Lys Ile Tyr	
	45
	50
	55
	60

gtc aac ggc acc att aca aca tca aat aca tcc gca tca aag att gac Val Asn Gly Thr Ile Thr Thr Ser Asn Thr Ser Ala Ser Lys Ile Asp	342
gtc aaa gac gtg tca aac gta tgg att gtc gga tca ggg acc aaa ggg Val Lys Asp Val Ser Asn Val Ser Ile Val Gly Ser Gly Thr Lys Gly	390
gaa ctc aaa ggg atc ggc atc aaa ata tgg cgg gcc aac aac atc atc Glu Leu Lys Gly Ile Gly Ile Lys Ile Trp Arg Ala Asn Asn Ile Ile	438
atc cgc aac ttg aaa att cac gag gtc gcc tca ggc gat aaa gac gcg Ile Arg Asn Leu Lys Ile His Glu Val Ala Ser Gly Asp Lys Asp Ala	486
atc ggc att gaa ggc cct tct aaa aac att tgg gtt gat cat aat gag Ile Gly Ile Glu Gly Pro Ser Lys Asn Ile Trp Val Asp His Asn Glu	534
ctt tac cac agc ctg aac gtt gac aaa gat tac tat gac gga tta ttt Leu Tyr His Ser Leu Asn Val Asp Lys Asp Tyr Tyr Asp Gly Leu Phe	582
gac gtc aaa aga gat gcg gaa tat att aca ttc tct tgg aac tat gtg Asp Val Lys Arg Asp Ala Glu Tyr Ile Thr Phe Ser Trp Asn Tyr Val	630
cac gat gga tgg aaa tca atg ctg atg ggt tca tcg gac agc gat aat His Asp Gly Trp Lys Ser Met Leu Met Gly Ser Ser Asp Ser Asp Asn	678
tac aac agg acg att aca ttc cat cat aac tgg ttt gag aat ctg aat Tyr Asn Arg Thr Ile Thr Phe His His Asn Trp Phe Glu Asn Leu Asn	726
tcg cgt gtg ccg tca ttc cgt ttc gga gaa ggc cat att tac aac aac Ser Arg Val Pro Ser Phe Arg Phe Gly Glu Gly His Ile Tyr Asn Asn	774
tat ttc aat aaa atc atc gac agc gga att aat tcg agg atg ggc gcg Tyr Phe Asn Lys Ile Ile Asp Ser Gly Ile Asn Ser Arg Met Gly Ala	822
cgc atc aga att gag aac aac ctc ttt gaa aac gcc aaa gat ccg att Arg Ile Arg Ile Glu Asn Asn Leu Phe Glu Asn Ala Lys Asp Pro Ile	870
gtc tct tgg tac agc agt tca ccg ggc tat tgg cat gta tcc aac aac Val Ser Trp Tyr Ser Ser Ser Pro Gly Tyr Trp His Val Ser Asn Asn	918
aaa ttt gta aac tct agg ggc agt atg ccg act acc tct act aca acc Lys Phe Val Asn Ser Arg Gly Ser Met Pro Thr Thr Ser Thr Thr Thr	966
tat aat ccg cca tac agc tac tca ctc gac aat gtc gac aat gta aaa Tyr Asn Pro Pro Tyr Ser Tyr Ser Leu Asp Asn Val Asp Asn Val Lys	1014
tca atc gtc aag caa aat gcc gga gtc ggc aaa atc aat cca gct agc Ser Ile Val Lys Gln Asn Ala Gly Val Gly Lys Ile Asn Pro Ala Ser	1062
gaa gcc acc tac ccc ggc aag tgc tac aag aag gac aac atc tgc aag Glu Ala Thr Tyr Pro Gly Lys Cys Tyr Lys Lys Asp Asn Ile Cys Lys	1110

ES 2 368 221 T3

zac	aag	gcc	cag	tcc	ggc	aag	acc	ggc	atc	tgc	aag	tgc	tac	gtc	aag	1158
Tyr	Lys	Ala	Gln	Ser	Gly	Lys	Thr	Gly	Ile	Cys	Lys	Cys	Tyr	Val	Lys	
		335					340					345				
cgc	tgc	ccc	cgc	gac	ggc	gcc	aag	tgc	gac	ctc	gac	tcc	tac	aag	ggc	1206
Arg	Cys	Pro	Arg	Asp	Gly	Ala	Lys	Cys	Asp	Leu	Asp	Ser	Tyr	Lys	Gly	
	350				355						360					
aag	tgc	cac	tgc	tagacgcgt												1227
Lys	Cys	His	Cys													
365																

<210> 112

<211> 397

5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> constructo sintético

10

<400> 112

Met Lys Gln Gln Lys Arg Leu Tyr Ala Arg Leu Leu Thr Leu Leu Phe
 -25 -20 -15
 Ala Leu Ile Phe Leu Leu Pro His Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ser Ala
 -10 -5 -1 1
 Leu Asn Ser Gly Lys Val Asn Pro Leu Ala Asp Phe Ser Leu Lys Gly
 5 10 15
 Phe Ala Ala Leu Asn Gly Gly Thr Thr Gly Gly Glu Gly Gly Gln Thr
 20 25 30 35
 Val Thr Val Thr Thr Gly Asp Gln Leu Ile Ala Ala Leu Lys Asn Lys
 40 45 50
 Asn Ala Asn Thr Pro Leu Lys Ile Tyr Val Asn Gly Thr Ile Thr Thr
 55 60 65
 Ser Asn Thr Ser Ala Ser Lys Ile Asp Val Lys Asp Val Ser Asn Val
 70 75 80
 Ser Ile Val Gly Ser Gly Thr Lys Gly Glu Leu Lys Gly Ile Gly Ile
 85 90 95
 Lys Ile Trp Arg Ala Asn Asn Ile Ile Ile Arg Asn Leu Lys Ile His
 100 105 110 115
 Glu Val Ala Ser Gly Asp Lys Asp Ala Ile Gly Ile Glu Gly Pro Ser
 120 125 130
 Lys Asn Ile Trp Val Asp His Asn Glu Leu Tyr His Ser Leu Asn Val
 135 140 145

Asp Lys Asp Tyr Tyr Asp Gly Leu Phe Asp Val Lys Arg Asp Ala Glu
 150 155 160
 Tyr Ile Thr Phe Ser Trp Asn Tyr Val His Asp Gly Trp Lys Ser Met
 165 170 175
 Leu Met Gly Ser Ser Asp Ser Asp Asn Tyr Asn Arg Thr Ile Thr Phe
 180 185 190 195
 His His Asn Trp Phe Glu Asn Leu Asn Ser Arg Val Pro Ser Phe Arg
 200 205 210
 Phe Gly Glu Gly His Ile Tyr Asn Asn Tyr Phe Asn Lys Ile Ile Asp
 215 220 225
 Ser Gly Ile Asn Ser Arg Met Gly Ala Arg Ile Arg Ile Glu Asn Asn
 230 235 240
 Leu Phe Glu Asn Ala Lys Asp Pro Ile Val Ser Trp Tyr Ser Ser Ser
 245 250 255
 Pro Gly Tyr Trp His Val Ser Asn Asn Lys Phe Val Asn Ser Arg Gly
 260 265 270 275
 Ser Met Pro Thr Thr Ser Thr Thr Thr Tyr Asn Pro Pro Tyr Ser Tyr
 280 285 290
 Ser Leu Asp Asn Val Asp Asn Val Lys Ser Ile Val Lys Gln Asn Ala
 295 300 305
 Gly Val Gly Lys Ile Asn Pro Ala Ser Glu Ala Thr Tyr Pro Gly Lys
 310 315 320
 Cys Tyr Lys Lys Asp Asn Ile Cys Lys Tyr Lys Ala Gln Ser Gly Lys
 325 330 335
 Thr Gly Ile Cys Lys Cys Tyr Val Lys Arg Cys Pro Arg Asp Gly Ala
 340 345 350 355
 Lys Cys Asp Leu Asp Ser Tyr Lys Gly Lys Cys His Cys
 360 365

<210> 113

5 <211> 26

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 113

tataacgcgt ctagcagtgg cacttg 26

5

<210> 114

<211> 1297

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> Fragmento de ADN (PP1331-2 Sac1 Mlu1)

<220>

15

<221> CDS

<222> (27)..(1289)

<220>

<221> péptido mat

20

<222> (114)..(1289)

<220>

<221> función miscelánea

<222> (114)..(1055)

25

<223> Pectato liasa

<220>

<221> función miscelánea

<222> (1236)..(1289)

30

<223> novispirina G10

<400> 114

gagctcattg aaaggggagg agaatc atg aaa caa caa aaa cgg ctt tac gcc	53
Met Lys Gln Gln Lys Arg Leu Tyr Ala	
	-25
cga ttg ctg acg ctg tta ttt gcg ctc atc ttc ttg ctg cct cat tct	101
Arg Leu Leu Thr Leu Leu Phe Ala Leu Ile Phe Leu Leu Pro His Ser	
	-20
	-15
	-10
	-5
gca gcc gcg gca gct tct gcc tta aac tcg gcc aaa gta aat ccg ctt	149
Ala Ala Ala Ala Ala Ser Ala Leu Asn Ser Gly Lys Val Asn Pro Leu	
	-1
	1
	5
	10
gcc gac ttc agc tta aaa gcc ttt gcc gca cta aac gcc gga aca acg	197
Ala Asp Phe Ser Leu Lys Gly Phe Ala Ala Leu Asn Gly Gly Thr Thr	
	15
	20
	25
ggc gga gaa gcc ggt cag acg gta acc gta aca acg gga gat cag ctg	245
Gly Gly Glu Gly Gly Gln Thr Val Thr Val Thr Thr Gly Asp Gln Leu	
	30
	35
	40
att gcg gca tta aaa aat aag aat gca aat acg cct tta aaa att tat	293
Ile Ala Ala Leu Lys Asn Lys Asn Ala Asn Thr Pro Leu Lys Ile Tyr	
	45
	50
	55
	60
gtc aac gcc acc att aca aca tca aat aca tcc gca tca aag att gac	341
Val Asn Gly Thr Ile Thr Thr Ser Asn Thr Ser Ala Ser Lys Ile Asp	
	65
	70
	75
gtc aaa gac gtg tca aac gta tcg att gtc gga tca ggg acc aaa ggg	389
Val Lys Asp Val Ser Asn Val Ser Ile Val Gly Ser Gly Thr Lys Gly	
	80
	85
	90
gaa ctc aaa ggg atc gcc atc aaa ata tgg cgg gcc aat aac atc atc	437
Glu Leu Lys Gly Ile Gly Ile Lys Ile Trp Arg Ala Asn Asn Ile Ile	
	95
	100
	105
atc cgc aac ttg aaa att cac gag gtc gcc tca ggc gat aaa gac gcg	485
Ile Arg Asn Leu Lys Ile His Glu Val Ala Ser Gly Asp Lys Asp Ala	
	110
	115
	120

atc Ile 125	ggc Gly	att Ile	gaa Glu	ggc Gly	cct Pro 130	tct Ser	aaa Lys	aac Asn	att Ile	tgg Trp 135	ggt Val	gat Asp	cat His	aat Asn	gag Glu 140	533
ctt Leu	tac Tyr	cac His	agc Ser	ctg Leu 145	aac Asn	ggt Val	gac Asp	aaa Lys	gat Asp 150	tac Tyr	tat Tyr	gac Asp	gga Gly	tta Leu 155	ttt Phe	581
gac Asp	gtc Val	aaa Lys	aga Arg 160	gat Asp	gcg Ala	gaa Glu	tat Tyr	att Ile 165	aca Thr	ttc Phe	tct Ser	tgg Trp	aac Asn 170	tat Tyr	gtg Val	629
cac His	gat Asp	gga Gly 175	tgg Trp	aaa Lys	tca Ser	atg Met	ctg Leu 180	atg Met	ggt Gly	tca Ser	tcg Ser	gac Asp 185	agc Ser	gat Asp	aat Asn	677
tac Tyr	aac Asn 190	agg Arg	acg Thr	att Ile	aca Thr	ttc Phe 195	cat His	cat His	aac Asn	tgg Trp	ttt Phe 200	gag Glu	aat Asn	ctg Leu	aat Asn	725
tcg Ser 205	cgt Arg	gtg Val	tcg Ser	tca Ser	ttc Phe 210	cgt Arg	ttc Phe	gga Gly	gaa Glu	ggc Gly 215	cat His	att Ile	tac Tyr	aac Asn	aac Asn 220	773
tat Tyr	ttc Phe	aat Asn	aaa Lys	atc Ile 225	atc Ile	gac Asp	agc Ser	gga Gly	att Ile 230	aat Asn	tcg Ser	agg Arg	atg Met	ggc Gly 235	gcg Ala	821
cgc Arg	atc Ile	aga Arg	att Ile 240	gag Glu	aac Asn	aac Asn	ctc Leu	ttt Phe 245	gaa Glu	aac Asn	gcc Ala	aaa Lys	gat Asp 250	ccg Pro	att Ile	869
gtc Val	tct Ser	tgg Trp 255	tac Tyr	agc Ser	agt Ser	tca Ser	ccg Pro 260	ggc Gly	tat Tyr	tgg Trp	cat His	gta Val 265	tcc Ser	aac Asn	aac Asn	917
aaa Lys 270	ttt Phe	gta Val	aac Asn	tct Ser	agg Arg	ggc Gly 275	agt Ser	atg Met	ccg Pro	act Thr	acc Thr 280	tct Ser	act Thr	aca Thr	acc Thr	965
tat Tyr 285	aat Asn	ccg Pro	cca Pro	tac Tyr	agc Ser 290	tac Tyr	tca Ser	ctc Leu	gac Asp	aat Asn 295	gtc Val	gac Asp	aat Asn	gta Val	aaa Lys 300	1013
tca Ser	atc Ile	gtc Val	aag Lys	caa Gln 305	aat Asn	gcc Ala	gga Gly	gtc Val	ggc Gly 310	aaa Lys	atc Ile	aat Asn	cca Pro	gct Ala 315	agc Ser	1061
ttg Leu	gat Asp	aaa Lys	aga Arg 320	gag Glu	gct Ala	gaa Glu	gct Ala	tgt Cys 325	gag Glu	gaa Glu	gag Glu	aga Arg	aat Asn 330	gca Ala	gaa Glu	1109
gaa Glu	gaa Glu	aga Arg 335	aga Arg	gat Asp	gaa Glu	cca Pro	gat Asp 340	gaa Glu	agg Arg	gat Asp	gct Ala	caa Gln 345	gtg Val	gaa Glu	cat His	1157
aat Asn 350	gcg Ala	cgc Arg	gag Glu	gct Ala	gaa Glu	gct Ala 355	gat Asp	gcg Ala	gaa Glu	gcg Ala	gtg Val 360	ggc Gly	ccg Pro	gaa Glu	gcg Ala	1205
ttt Phe 365	gcg Ala	gat Asp	gaa Glu	gat Asp	ctg Leu 370	gat Asp	cca Pro	tgg Trp	gaa Glu	aag Lys 375	aac Asn	ctc Leu	aga Arg	cga Arg	atc Ile 380	1253
ata Ile	agg Arg	aaa Lys	ggt Gly	ata Ile 385	cac His	atc Ile	att Ile	aag Lys	aaa Lys 390	tac Tyr	gga Gly	taacgcgt			1297	

<210> 115

<211> 421

<212> PRT

<213> Artificial

5

<220>

<223> Constructo sintético

<400> 115

Met Lys Gln Gln Lys Arg Leu Tyr Ala Arg Leu Leu Thr Leu Leu Phe
 -25 -20 -15
 Ala Leu Ile Phe Leu Leu Pro His Ser Ala Ala Ala Ala Ala Ser Ala
 -10 -5 -1 1
 Leu Asn Ser Gly Lys Val Asn Pro Leu Ala Asp Phe Ser Leu Lys Gly
 5 10 15
 Phe Ala Ala Leu Asn Gly Gly Thr Thr Gly Gly Glu Gly Gly Gln Thr
 20 25 30 35
 Val Thr Val Thr Thr Gly Asp Gln Leu Ile Ala Ala Leu Lys Asn Lys
 40 45 50
 Asn Ala Asn Thr Pro Leu Lys Ile Tyr Val Asn Gly Thr Ile Thr Thr
 55 60 65
 Ser Asn Thr Ser Ala Ser Lys Ile Asp Val Lys Asp Val Ser Asn Val
 70 75 80
 Ser Ile Val Gly Ser Gly Thr Lys Gly Glu Leu Lys Gly Ile Gly Ile
 85 90 95
 Lys Ile Trp Arg Ala Asn Asn Ile Ile Ile Arg Asn Leu Lys Ile His
 100 105 110 115
 Glu Val Ala Ser Gly Asp Lys Asp Ala Ile Gly Ile Glu Gly Pro Ser
 120 125 130
 Lys Asn Ile Trp Val Asp His Asn Glu Leu Tyr His Ser Leu Asn Val
 135 140 145
 Asp Lys Asp Tyr Tyr Asp Gly Leu Phe Asp Val Lys Arg Asp Ala Glu
 150 155 160
 Tyr Ile Thr Phe Ser Trp Asn Tyr Val His Asp Gly Trp Lys Ser Met
 165 170 175
 Leu Met Gly Ser Ser Asp Ser Asp Asn Tyr Asn Arg Thr Ile Thr Phe
 180 185 190 195
 His His Asn Trp Phe Glu Asn Leu Asn Ser Arg Val Ser Ser Phe Arg

				200						205					210
Phe	Gly	Glu	Gly	His	Ile	Tyr	Asn	Asn	Tyr	Phe	Asn	Lys	Ile	Ile	Asp
			215					220					225		
Ser	Gly	Ile	Asn	Ser	Arg	Met	Gly	Ala	Arg	Ile	Arg	Ile	Glu	Asn	Asn
		230					235					240			
Leu	Phe	Glu	Asn	Ala	Lys	Asp	Pro	Ile	Val	Ser	Trp	Tyr	Ser	Ser	Ser
	245					250					255				
Pro	Gly	Tyr	Trp	His	Val	Ser	Asn	Asn	Lys	Phe	Val	Asn	Ser	Arg	Gly
260					265					270					275
Ser	Met	Pro	Thr	Thr	Ser	Thr	Thr	Thr	Tyr	Asn	Pro	Pro	Tyr	Ser	Tyr
				280					285					290	
Ser	Leu	Asp	Asn	Val	Asp	Asn	Val	Lys	Ser	Ile	Val	Lys	Gln	Asn	Ala
			295					300					305		
Gly	Val	Gly	Lys	Ile	Asn	Pro	Ala	Ser	Leu	Asp	Lys	Arg	Glu	Ala	Glu
		310					315					320			
Ala	Cys	Glu	Glu	Glu	Arg	Asn	Ala	Glu	Glu	Glu	Arg	Arg	Asp	Glu	Pro
	325					330					335				
Asp	Glu	Arg	Asp	Ala	Gln	Val	Glu	His	Asn	Ala	Arg	Glu	Ala	Glu	Ala
340					345					350					355
Asp	Ala	Glu	Ala	Val	Gly	Pro	Glu	Ala	Phe	Ala	Asp	Glu	Asp	Leu	Asp
				360					365					370	
Pro	Trp	Glu	Lys	Asn	Leu	Arg	Arg	Ile	Ile	Arg	Lys	Gly	Ile	His	Ile
			375					380					385		
Ile	Lys	Lys	Tyr	Gly											
		390													

<210> 116

<211> 28

5

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

10

<400> 116

tataacgcgt tatccgtatt tcttaatg 28

<210> 117
 <211> 53
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Péptido

 10 <220>
 <221> FUNCIÓN MISCELÁNEA
 <222> (i)..(s)
 <223> Dominio de extinción

 15 <220>
 <221> FUNCIÓN MISCELÁNEA
 <222> (6)..(14)
 <223> Conector

 20 <220>
 <221> FUNCIÓN MISCELÁNEA
 <222> (15)..()
 <223> PR39

 25 <400> 117

Asp Asp Asp Asp Glu Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Glu Arg Arg
1 5 10 15

Arg Pro Arg Pro Pro Tyr Leu Pro Arg Pro Arg Pro Pro Pro Phe Phe
20 25 30

Pro Pro Arg Leu Pro Pro Arg Ile Pro Pro Gly Phe Pro Pro Arg Phe
35 40 45

Pro Pro Arg Phe Pro
50

 <210> 118
 <211> 57
 30 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>

<223> Péptido

<220>

<221> FUNCIÓN MISCELÁNEA

<222> (1)..(5)

5 <223> Dominio de extinción

<220>

<221> FUNCIÓN MISCELÁNEA

<222> (6)..(18)

10 <223> Conector

<220>

<221> FUNCIÓN MISCELÁNEA

<222> (19)..()

15 <223> PR39

<400> 118

Asp Asp Asp Asp Glu Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Glu Arg Arg Arg Pro Arg Pro Pro Tyr Leu Pro Arg Pro Arg Pro
 20 25 30

Pro Pro Phe Phe Pro Pro Arg Leu Pro Pro Arg Ile Pro Pro Gly Phe
 35 40 45

Pro Pro Arg Phe Pro Pro Arg Phe Pro
 50 55

20

REIVINDICACIONES

1. Uso de un péptido de protección en la expresión recombinante de un péptido antimicrobiano o enzima antimicrobiana, donde el péptido de protección engloba entre 1 y 100 residuos de aminoácidos, y donde al menos el 50% de los residuos de aminoácidos comprendidos en el péptido de protección son D (Asp) y/o E (Glu), donde el péptido de protección se funde al péptido antimicrobiano o enzima antimicrobiana, y donde el efecto antimicrobiano inhibe el crecimiento de la célula huésped.
 - a) proporcionar un candidato de protección peptídica que engloba entre 1 y 100 residuos de aminoácidos, y donde al menos el 50% de los residuos de aminoácidos comprendidos en el péptido de protección son D (Asp) y/o E (Glu);
 - b) preparar un constructo de ADN comprendiendo una primera secuencia de ADN que codifica el candidato de protección peptídica y una segunda secuencia de ADN que codifica un péptido antimicrobiano o enzima antimicrobiana;
 - c) transformar una célula huésped con el constructo de ADN de b) y cultivar la célula huésped transformada para obtener expresión del constructo de ADN;
 - d) estimar la viabilidad de la célula huésped transformada y/o el rendimiento del péptido antimicrobiano o enzima antimicrobiana; y
 - e) identificar un candidato de protección peptídica que cuando se usa en un constructo de ADN según el paso b), para la transformación de una célula huésped según la fase c), resulta en una viabilidad aumentada de la célula huésped, y/o un rendimiento aumentado del péptido antimicrobiano o enzima antimicrobiana, cuando se estima según el paso d).
3. Célula huésped microbiana recombinante comprendiendo una primera secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido antimicrobiano o enzima antimicrobiana, una segunda secuencia heteróloga de ácidos nucleicos que codifica una enzima, y una secuencia de ADN que codifica un péptido de protección tal y como se define en la reivindicación 1; donde el péptido de protección se fusiona con el péptido antimicrobiano o enzima antimicrobiana, y donde el efecto antimicrobiano inhibe el crecimiento de la célula huésped.
4. Célula huésped según la reivindicación 3, donde la primera y/o la segunda secuencia de ácidos nucleicos está/están integrada/s en el cromosoma de la célula huésped.
5. Célula huésped según la reivindicación 3, que contiene un constructo de ADN que incorpora tanto la primera como la segunda secuencia de ácidos nucleicos.
6. Célula huésped según la reivindicación 3, donde la primera secuencia de ácidos nucleicos se incorpora en un primer constructo de ADN y la segunda secuencia de ácidos nucleicos se incorpora en un segundo constructo de ADN.
7. Célula huésped según la reivindicación 6, comprendiendo además un tercer constructo de ADN que incorpora tanto la primera como la segunda secuencia de ácidos nucleicos.
8. Constructo de ácidos nucleicos comprendiendo una primera secuencia de ácidos nucleicos que codifica un péptido antimicrobiano o enzima antimicrobiana; una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica una enzima, conectada operativamente a una o más secuencias de control que dirigen la expresión de la enzima y el péptido antimicrobiano o enzima antimicrobiana en un huésped de expresión adecuado, donde la segunda secuencia de ácidos nucleicos es heteróloga al huésped de expresión; y una secuencia de ADN que codifica un péptido de protección según la reivindicación 1; y donde el péptido de protección se fusiona con el péptido antimicrobiano o enzima antimicrobiana, y donde el efecto antimicrobiano inhibe el crecimiento de la célula huésped.
9. Método para la producción de una enzima y/o un péptido antimicrobiano o enzima antimicrobiana, comprendiendo el método: (a) cultivo de la célula huésped recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 3-7 para producir un sobrenadante comprendiendo la enzima y el péptido antimicrobiano o enzima antimicrobiana; y (b) recuperación de la enzima y/o el péptido antimicrobiano o enzima antimicrobiana.
10. Producto de fusión comprendiendo una enzima, un péptido antimicrobiano o enzima antimicrobiana, y un péptido de protección tal y como se define en la reivindicación 1; donde el péptido de protección está localizado entre la enzima y el péptido antimicrobiano o enzima antimicrobiana.
11. Aditivo de pienso comprendiendo
 - a) al menos un producto de fusión según la reivindicación 10,
 - b) al menos una vitamina liposoluble, y/o

c) al menos una vitamina hidrosoluble, y/o

d) al menos un oligoelemento.

12. Composición de pienso para animales con un contenido bruto de proteína de 50 a 800 g/kg y comprendiendo al menos un producto de fusión según la reivindicación 10.
- 5 13. Planta transgénica, o parte de planta capaz de expresar una enzima, un péptido antimicrobiano o enzima antimicrobiana, y un péptido de protección tal y como se define en la reivindicación 1; donde el péptido de protección se fusiona con el péptido antimicrobiano o enzima antimicrobiana, y donde el efecto antimicrobiano inhibe el crecimiento de la célula huésped.
- 10 14. Animal transgénico no humano, o productos, o elementos de los mismos, capaz de expresar una enzima, un péptido antimicrobiano o enzima antimicrobiana, y un péptido de protección tal y como se define en la reivindicación 1; donde el péptido de protección se fusiona con el péptido antimicrobiano o enzima antimicrobiana, y donde el efecto antimicrobiano inhibe el crecimiento de la célula huésped.
- 15 15. Uso del producto de fusión según la reivindicación 10 en pienso para animales.
16. Uso de coexpresión de un péptido antimicrobiano o enzima antimicrobiana, una enzima, y un péptido de protección tal y como se define en la reivindicación 1 como una herramienta para mejorar el rendimiento del péptido antimicrobiano o enzima antimicrobiana y/o para mejorar la economía de producción global; donde el péptido de protección se fusiona con el péptido antimicrobiano o enzima antimicrobiana, y donde el efecto antimicrobiano inhibe el crecimiento de la célula huésped.