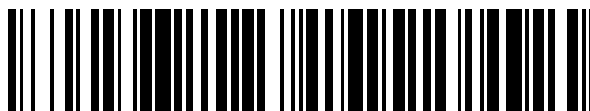


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 150**

51 Int. Cl.:
C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06725046 .4**
96 Fecha de presentación: **14.03.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1861421**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.12.2007**

54 Título: **EXPRESIÓN RECOMBINANTE DE DEFENSINAS DE INSECTO EN ASPERGILLUS.**

30 Prioridad:
16.03.2005 DK 200500375

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.02.2012

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

72 Inventor/es:
**HOEGENHAUG, Hans-Henrik, Kristensen;
SCHNORR, Kirk, Matthew y
HANSEN, Mogens, Trier**

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

ES 2 375 150 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

Expresión recombinante de defensinas de insecto en *Aspergillus*

5 Campo técnico

[0001] La presente invención se refiere a la expresión recombinante de péptidos antimicrobianos de defensina de insecto en *Aspergillus*.

10 Estado de la técnica

[0002] Las defensinas pertenecen a una clase de péptidos antimicrobianos pequeños. Éstos son capaces de matar un amplio espectro de microorganismos, algunos de los cuales se están volviendo cada vez más resistentes frente a antibióticos tradicionales. Por esta razón, es también cada vez más interesante el ser capaz de producir defensinas en cantidades grandes a un bajo coste.

[0003] Dado que las defensinas normalmente sólo comprenden de 30-50 residuos de aminoácidos, éstas son frecuentemente difíciles de producir eficazmente usando métodos de fermentación recombinante. La síntesis química de péptidos es un método alternativo, pero es también costoso cuando los péptidos exceden los 25-30 residuos de aminoácidos. Otra complicación es que las defensinas comprenden un patrón de cisteína distintivo, que es difícil de crear por síntesis química.

[0004] Por consiguiente, es un objetivo de la presente invención proporcionar métodos para la obtención de niveles mejorados de expresión de péptidos antimicrobianos de defensina de insecto en la fermentación recombinante de *Aspergillus*.

Resumen de la invención

[0005] Los inventores de la presente invención han descubierto que insertando una o más secuencias de intrón en un constructo de ácido nucleico, que dirige la expresión de una defensina de insecto, el nivel de expresión recombinante se puede mejorar en más de un 50% en comparación con el uso de un constructo de ácido nucleico sin secuencias de intrón. La secuencia(s) de intrón se puede insertar en cualquier lugar del constructo de ácido nucleico, tal como en la secuencia que codifica la defensina madura, o incluso en una secuencia que codifica un péptido señal.

[0006] Por consiguiente, la presente invención se refiere a una célula huésped recombinante de *Aspergillus*, comprendiendo un constructo de ácido nucleico, comprendiendo este constructo de ácido nucleico una secuencia de ácido nucleico foránea que codifica una defensina de insecto y una o más secuencia(s) de intrón.

[0007] En un segundo aspecto, la invención se refiere a un método para la producción recombinante de una defensina de insecto en una célula huésped de *Aspergillus*, que incluye el cultivo de la célula huésped de *Aspergillus* comprendiendo un constructo de ácido nucleico, comprendiendo este constructo de ácido nucleico una secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido de defensina de insecto y una o más secuencia(s) de intrón, y recuperación del péptido de defensina de insecto.

[0008] En un tercer aspecto, la invención se refiere al uso de un constructo de ácido nucleico, que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de defensina de insecto y una o más secuencia(s) de intrón, para mejorar el nivel de expresión recombinante de la defensina de insecto en una célula huésped de *Aspergillus*.

Definiciones

[0009] Actividad antimicrobiana: 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 el término "antimicrobiano" se refiere a que hay un efecto bactericida y/o bacteriostático y/o fungicida y/o fungistático y/o un efecto virucida, donde el término "bactericida" debe entenderse como capaz de matar células bacterianas. El término "bacteriostático" debe ser entendido como capaz de inhibir el crecimiento bacteriano, es decir, inhibir células bacterianas en crecimiento. El término "fungicida" debe entenderse como capaz de matar células fúngicas. El término "fungistático" debe entenderse como capaz de inhibir el crecimiento fúngico, es decir, inhibir células fúngicas en crecimiento. El término "virucida" debe entenderse como capaz de inactivar virus. El término "células microbianas" denota células bacterianas o fúngicas (incluyendo levaduras).

[0010] En el contexto de la presente invención el término "inhibición del crecimiento de células microbianas" se refiere a que las células están en el estado de no crecimiento, es decir, que no son capaces de propagarse.

5 [0011] Para fines de la presente invención, la actividad antimicrobiana se puede determinar según el procedimiento descrito por Lehrer y colaboradores, *Journal of Immunological Methods*, Vol. 137 (2) págs. 167-174 (1991). Alternativamente, la actividad antimicrobiana se puede determinar según las directrices de NCCLS del CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, antes conocido como *National Committee for Clinical and Laboratory Standards*).

10 [0012] Las defensinas con 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 de 25%(p/p), preferiblemente en una solución acuosa de 10%(p/p), más preferiblemente en una solución acuosa de 5%(p/p), incluso más preferiblemente en una solución acuosa de 1%(p/p), de la forma más preferible en una solución acuosa de 0,5%(p/p), y en particular en una solución acuosa de 0,1%(p/p) de las defensinas con actividad antimicrobiana.

15

[0013] Las defensinas con actividad antimicrobiana también pueden 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.

20

[0014] Las defensinas con actividad antimicrobiana pueden ser capaces de reducir el número de células vivas de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) a 1/100 después 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 de 25%(p/p), preferiblemente en una solución acuosa de 10%(p/p), más preferiblemente en una solución acuosa de 5%(p/p), incluso más preferiblemente en una solución acuosa de 1 %(p/p), de la forma más preferible en una solución acuosa de 0,5%(p/p), y en particular en una solución acuosa de 0,1%(p/p) de las defensinas con actividad antimicrobiana.

25

30

[0015] Las defensinas con actividad antimicrobiana también pueden 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 de 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

[0016] Las defensinas tienen como mínimo un 20%, preferiblemente al menos un 40%, más preferiblemente al menos un 50%, más preferiblemente al menos un 60%, más preferiblemente al menos un 70%, más preferiblemente al menos un 80%, incluso más preferiblemente al menos un 90%, de la forma más preferible al menos un 95%, e incluso de la forma más preferible al menos un 100% de la actividad antimicrobiana de la defensina que consiste en la secuencia de aminoácido mostrada como aminoácidos 1 a 42 de la SEC ID NO:2.

40

[0017] ADNc: el término "ADNc" se define aquí como una molécula de ADN que puede estar preparada por transcripción inversa de una molécula de ARNm madura, unida, obtenida a partir de una célula eucariótica. El ADNc carece de las secuencias de intrón que normalmente están presentes en el ADN genómico correspondiente. La transcripción principal inicial de ARN es un precursor de ARNm que se procesa a través de una serie de pasos antes de que aparezca como ARNm maduro unido. Estos pasos incluyen la eliminación de secuencias de intrón por un proceso llamado empalme. El ADNc se deriva de la falta de ARNm, por lo tanto, de cualquier secuencia de intrón.

45

50

[0018] Constructo de ácido nucleico: el término "constructo de ácido nucleico" como se utiliza en este caso se refiere a una molécula de ácido nucleico, bien monocatenaria o bicatenaria, que está aislada de un gen de origen natural o que está modificada para contener segmentos de ácido nucleico de una forma en la que de otra manera no existiría en la naturaleza. El término constructo de ácido nucleico es sinónimo del término "casette de expresión" cuando el constructo de ácido nucleico contiene las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia codificante.

55

[0019] Secuencia de control: el término "secuencias de control" se define aquí para incluir todos los componentes que son necesarios o ventajosos para la expresión de un polinucleótido que codifica una defensina. Cada secuencia de control puede ser nativa o foránea a la secuencia de nucleótidos que codifica la defensina. Tales secuencias de control incluyen,

60

pero no se limitan a, una guía, 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 traduccionales y transcripcionales. Las secuencias de control se pueden proporcionar con enlazadores con el propósito de introducir sitios de restricción específicos facilitando la unión de las secuencias de control con la región de codificación de la secuencia nucleotídica que codifica una defensiva.

[0020] Operativamente enlazado: el término "operativamente enlazado" denota en este caso una configuración en la que una secuencia de control se coloca en una posición apropiada en relación a la secuencia codificante de la secuencia polinucleotídica de tal modo que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia codificante de una defensiva.

[0021] Secuencia codificante: cuando se usa aquí el término "secuencia codificante" se refiere a una secuencia nucleotídica, que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de su producto proteínico. Los límites de la secuencia codificante están determinados generalmente por un marco de lectura abierto, que se inicia normalmente con el codón de inicio ATG o codones de inicio alternativos tales como GTG y TTG. La secuencia codificante puede ser una secuencia de ADN, ADNc, o nucleotídica recombinante.

[0022] Expresión: el término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción de la defensiva, incluyendo, pero no limitado a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional, y secreción.

[0023] Vector de expresión: el término "vector de expresión" se define aquí como una molécula de ADN circular o lineal que comprende un polinucleotídico que codifica un péptido de defensiva, y que está operativamente enlazado con nucleótidos adicionales que proveen su expresión.

[0024] Célula huésped: el término "célula huésped", como se utiliza en este caso, incluye cualquier tipo celular que es susceptible de transformación, transfección, transducción, y similares con un constructo de ácido nucleico de la presente invención.

[0025] Modificación: el término "modificación" se refiere aquí a cualquier modificación química de la defensiva. La modificación(es) puede ser sustitución(es), delección(es) y/o inserciones(s) del aminoácido(s) al igual que sustitución(es) de cadena(s) laterales de aminoácidos, o uso de aminoácidos innaturales con características similares en la secuencia de aminoácidos. En particular, la modificación(es) puede ser amidación, tal como amidación del C-término.

[0026] Identidad: la relación entre dos secuencias de aminoácido o entre dos secuencias nucleotídicas se describe con el parámetro "identidad".

[0027] Para fines de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el programa FASTA incluido en la versión 2.0x del paquete de programa 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). La matriz de puntuación utilizada fue BLOSUM50, la penalización de espacio fue -12, y la penalización de extensión de espacio fue -2.

[0028] El grado de identidad entre dos secuencias nucleotídicas se determina usando el mismo algoritmo y paquete de software que se ha descrito anteriormente. La matriz de puntuación usada fue la matriz de identidad, la penalización de espacio fue -16, y la penalización de extensión de espacio fue -4.

[0029] Alternativamente, se determina un alineamiento de dos secuencias de aminoácidos usando el programa Needle del paquete EMBOSS (<http://emboss.org>) versión 2.8.0. El programa de Needle implementa el algoritmo de alineamiento global descrito en Needleman, S. B. y Wunsch, C. D. (1970) *J. Mol. Biol.* 48, 443-453. La matriz de sustitución usada fue BLOSUM62, la penalización de abertura de espacio es 10, y la penalización de extensión de espacio es 0.5.

[0030] El grado de identidad entre una secuencia de aminoácidos de la presente invención ("secuencia inventiva", p. ej. aminoácidos de 1 a 40 de la SEC ID NO:2) y una secuencia de aminoácido diferente ("secuencia foránea") se calcula como el número exacto de coincidencias en el solapamiento de un alineamiento de las dos secuencias, dividido por la longitud de la "secuencia inventiva" o la longitud de la "secuencia foránea", cualquiera que sea la más corta. El resultado se expresa en porcentaje de identidad.

[0031] Una correspondencia exacta ocurre cuando la "secuencia inventiva" y la "secuencia foránea" tienen residuos de aminoácidos idénticos en las mismas posiciones del solapamiento. La longitud de una secuencia es el número de residuos de aminoácidos en la secuencia (p. ej. la longitud de aminoácidos 1 a 40 de la SEC ID NO:2 es 40).

Descripción detallada

Defensinas

5 [0032] Las defensinas de la invención son cualquier péptido antimicrobiano reconocido por un experto en la técnica como perteneciente a la clase de las defensinas de insecto de péptidos antimicrobianos. Para determinar si un péptido antimicrobiano es una defensina de insecto, la secuencia de aminoácido se compara preferiblemente con los perfiles de modelos ocultos de markov (perfiles HMM) de la bien conocida base de datos PFAM (véase ejemplo 6).

10 [0033] Las defensinas de insecto también pueden ser defensinas de insecto sintéticas que comparten los rasgos característicos de la clase de las defensinas de insecto.

[0034] En una forma de realización, la secuencia de aminoácidos de una defensina de insecto comprende 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 residuos de cisteína, preferiblemente 6, 7, 8, 9, o 10 residuos de cisteína, más preferiblemente 6, 8, o 10 residuos de cisteína, y de la forma más preferible 6 u 8 residuos de cisteína.

15 [0035] Los ejemplos de defensinas de insecto incluyen, pero no se limitan a, drosomicina, heliomicina, γ 1-purotionina, defensina de insecto A, y las defensinas descritas en las solicitudes PCT del documentos WO 9953053 (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 21/10/1999 y del documento WO 02085934 (ENTOMED) 31/10/2002 o aquellas expuestas en las secuencias de aminoácidos maduras de SEC ID NO:2, SEC ID NO:4, SEC ID NO:6, SEC ID NO:8, SEC ID NO:10, SEC ID NO:12, SEC ID NO:14 y SEC ID NO:16. Una defensina de insecto según la invención puede comprender además una o más modificaciones químicas en comparación con estas secuencias de aminoácidos.

20 [0036] Las defensinas de insectos pueden estar definidas como péptidos antimicrobianos comprendiendo la secuencia de aminoácidos:

25 C-X₁-C-X₂-C-X₃-C-X₄-C-X₅-C

- donde

X₁ representa 5-16 aminoácidos,
 X₂ representa 3 aminoácidos, preferiblemente X₂ =Z₁ -Z₂ -Z₃, donde
 30 Z₁ representa cualquier aminoácido, preferiblemente Z₁ =A o H,
 Z₂ representa cualquier aminoácido, preferiblemente Z₂ =A o R,
 Z₃ representa cualquier aminoácido, preferiblemente Z₃ =H,
 X₃ representa 9-11 aminoácidos,
 X₄ representa, 4-10 aminoácidos,
 35 X₅ representa 1 aminoácido, preferiblemente X₅ =V, T, I, H, K, N o L.

[0037] En una forma de realización, la defensina tiene más de una actividad antimicrobiana seleccionada a partir de actividad antifúngica, actividad antibacteriana y actividad antivírica.

40 [0038] Una defensina se puede obtener a partir de microorganismos de cualquier género. Para los fines de la presente invención, el término "obtenido a partir de" como se utiliza en este caso en relación con una fuente dada debería significar que la defensina codificada por una secuencia nucleotídica se produce por la fuente o por una cepa en la que ha sido insertada la secuencia nucleotídica de la fuente. En un aspecto preferido, la defensina obtenida a partir de una fuente dada se secreta extracelularmente.

45 [0039] Una defensina puede ser una defensina fúngica, y más preferiblemente una defensina de levadura tal como una *Candida*, *Kluyveromices*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomices*, o una defensina *Yarrowia*, o más preferiblemente una defensina filamentosa fúngica tal como una *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Criptomoco*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomices*, *Penicillium*, *Piromyces*, *Schizofyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, o una defensina *Trichoderma*.

50 [0040] En un aspecto preferido, la defensina es una *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, o defensina *Saccharomices oviformis* con actividad antimicrobiana.

55 [0041] En otro aspecto preferido, la defensina es un *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*,

Fusarium sambucinum, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora*, *Crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, o defensiva *Trichoderma viride*.

5

[0042] Se entenderá que en el caso de las especies mencionadas, la descripción encierra ambos estados, el perfecto y el imperfecto, y otros equivalentes taxonómicos, p. ej., anamorfos, independientemente del nombre de la especie por el que se conocen. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente la identidad de equivalentes apropiados.

10

[0043] Las cepas de estas especies son de fácil acceso para el público en un número de colecciones de cultivo, tal como *American Type Culture Collection* (ATCC), *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSM), *Centraalbureau Voor Schimmelcultures* (CBS), y *Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center* (NRRL).

15

[0044] Además, tales defensinas se pueden identificar y obtener a partir de otras fuentes incluyendo microorganismos aislados de la naturaleza (p. ej., tierra, abonos, agua, etc.) usando las pruebas mencionadas anteriormente. Las técnicas para aislar microorganismos de hábitats naturales se conocen bien en la técnica. El polinucleótido puede ser obtenido entonces por revisión similar de una genoteca genómica o de ADNc de otro microorganismo. Una vez se ha detectado una secuencia polinucleótida que codifica una defensiva con la pruebas(s), el polinucleótido puede ser aislado o clonado utilizando técnicas que son bien conocidas por los expertos en la técnica (ver, p. ej., SAMBROOK, y colaboradores, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2. Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, ISBN 0879693096.).

20

25

[0045] Las defensinas también incluyen defensinas fundidas o defensinas de fusión divisibles en la que otra defensiva se funde en el N-término o el C-término de la defensiva o fragmento de la misma. Una defensiva fundida se produce por fundición de una secuencia de nucleótidos (o una parte de la misma) codificando otra defensiva a una secuencia de nucleótidos (o una parte de la misma). Técnicas para producir defensinas de fusión se conocen en la técnica, e incluyen la unión de las secuencias de codificación que codifican las defensinas de modo que éstas están en el marco y aquella expresión de la defensiva fundida está bajo control del mismo promotor(es) y terminador.

30

Secuencias de ácido nucleico

[0046] La presente descripción también se refiere a polinucleótidos con una secuencia nucleótida que codifica una defensiva.

35

[0047] Ejemplos de tales polinucleótidos incluyen, pero no se limitan a, aquellos descritos en la solicitud PCT del documento WO 99/53053.

40

[0048] En una forma de realización preferida, la secuencia nucleotida se establece en SEC ID NO:1, SEC ID NO:3, SEC ID NO:5, SEC ID NO:7, SEC ID NO:9, SEC ID NO:11, SEC ID NO:13 o SEC ID NO:15. En otra forma de realización preferida, la secuencia de nucleótidos es la región de codificación de defensiva madura de SEC ID NO:1, SEC ID NO:3, SEC ID NO:5, SEC ID NO:7, SEC ID NO:9, SEC ID NO:11, SEC ID NO:13 o SEC ID NO:15. La presente descripción también encierra secuencias nucleotidas que codifican una defensiva con la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:2, SEC ID NO:4, SEC ID NO:6, SEC ID NO:8, SEC ID NO:10, SEC ID NO:12, SEC ID NO:14 o SEC ID NO:16, o la defensiva madura de la misma, que difiere de SEC ID NO:1, SEC ID NO:3, SEC ID NO:5, SEC ID NO:7, SEC ID NO:9, SEC ID NO:11, SEC ID NO:13 o SEC ID NO:15 en virtud de la degeneración del código genético.

45

50

[0049] Las técnicas usadas para aislar o clonar un polinucleótido que codifica una defensiva se conocen en la técnica e incluyen el aislamiento de ADN genómico, preparación de ADNc, o una combinación de las mismas. La clonación de los polinucleótidos que codifican las defensinas de un ADN genómico de este tipo puede ser efectuada, p. ej., usando la bien conocida reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o selección de anticuerpos de genotecas de expresión para detectar fragmentos de ADN clonados con características estructurales compartidas. Ver p. ej., Innis y colaboradores, 1990, PCR: *A Guide to Methods and Application*, Academic Press, Nueva York. Se pueden utilizar otros procedimientos de amplificación de ácido nucleico tales como reacción en cadena de la ligasa (LCR), transcripción activada ligada (LAT) y amplificación basada en secuencias de nucleótidos (NASBA). Los polinucleótidos se pueden clonar a partir de una cepa de *Eurotium*, *Aspergillus*, *Pseudoplectania*, *Crassostrea*, *Mesobuthus* u otro o organismo relacionado y así, por ejemplo, puede ser una variante alélica o de especies de la región de codificación de defensiva de las secuencias nucleótidas.

55

60

[0050] La presente descripción también se refiere a polinucleótidos con secuencias nucleótidas que tienen un grado de identidad con la secuencia codificante de defensiva madura de SEC ID NO:1, SEC ID NO:3, SEC ID NO:5, SEC ID NO:7, SEC ID NO:9, SEC ID NO:11, SEC ID NO:13 o SEC ID NO:15 de al menos un 60%, preferiblemente de al menos un 65%, más preferiblemente de al menos un 70%, más preferiblemente de al menos un 75%, más preferiblemente de al menos un

80%, más preferiblemente de al menos un 85%, más preferiblemente de al menos un 90%, incluso más preferiblemente de al menos un 95%, y de la forma más preferible de al menos un 97% de identidad, que codifica un polipéptido antimicrobiano de defensina.

5 [0051] la modificación de una secuencia nucleótida que codifica una defensina puede ser necesaria para la síntesis de las defensinas sustancialmente similares a la defensina. El término "sustancialmente similar" a la defensina se refiere a formas de la defensina que no aparecen en la naturaleza. Estas defensinas pueden diferir en alguna forma creada genéticamente de la defensina aislada de su fuente nativa, p. ej., variantes artificiales que difieren en una actividad específica, la termoestabilidad, el pH óptimo, o similar. La secuencia variante puede estar construida basándose en la secuencia nucleótida presentada como la región de codificación de la defensina de SEC ID NO:1, SEC ID NO:3, SEC ID NO:5, SEC ID NO:7, SEC ID NO:9, SEC ID NO:11, SEC ID NO:13 o SEC ID NO:15 p. ej., una subsecuencia de la misma, y/o por introducción de sustituciones de nucleótido que no dan lugar a otra secuencia de aminoácidos de la defensina codificadas por la secuencia nucleótida, pero que se corresponden con el uso del codón del organismo huésped destinado para la producción de la enzima, o por introducción de sustituciones de nucleótido que puede dar lugar a una secuencia de aminoácidos diferente. Para una descripción general de sustitución de nucleótido, ver, p. ej., Ford y colaboradores, 1991, *Protein Expression and Purification* 2: 95-107.

20 [0052] Será aparente para los expertos en la técnica que tales sustituciones se pueden hacer fuera de las regiones críticas para la función de la molécula y aún así dar lugar a una defensinas activa. Los residuos de aminoácidos esenciales para la actividad de la defensina, y por lo tanto preferiblemente no sujetos a sustitución, se pueden identificar según procedimientos conocidos en la técnica, tal como mutagénesis sitio-dirigida o mutagénesis de escaneado de alanina (ver, p. ej., Cunningham y Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085). En ésta última técnica, las mutaciones se introducen en cada residuo cargado positivamente en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se evalúan en busca de actividad antimicrobiana para identificar residuos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula. Los sitios de interacción también pueden ser determinados por el análisis de la estructura tridimensional como determinado por técnicas tales como el análisis de resonancia magnética nuclear, cristalografía o etiquetado de fotoafinidad (ver, p. ej., de Vos y colaboradores, 1992, *Science* 255: 306-312, Smith y colaboradores, 1992, *Journal of Molecular Biology* 224: 899-904, Wlodaver y colaboradores, 1992, *FEBS Letters* 309: 59-64).

30 [0053] La presente descripción también se refiere a polinucleótidos que codifican una defensina de la invención, que se hibridan en condiciones de baja astringencia, preferiblemente en condiciones de astringencia media, más preferiblemente en condiciones de astringencia medio altas, incluso más preferiblemente en condiciones de astringencia altas, y de la forma más preferible en condiciones de astringencia muy altas con (i) la secuencia de nucleótidos de codificación del péptido maduro contenida en la SEC ID NO:1, SEC ID NO:3, SEC ID NO:5, SEC ID NO:7, SEC ID NO:9, SEC ID NO:11, SEC ID NO:13 o SEC ID NO:15, (ii) la secuencia de ADNc contenida en la SEC ID NO:1, SEC ID NO:3, SEC ID NO:5, SEC ID NO:7, SEC ID NO:9, SEC ID NO:11, SEC ID NO:13 o SEC ID NO:15, o (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii), o variantes alélicas y subsecuencias de las mismas (Sambrook y colaboradores, 1989, *supra*), tal y como se define aquí.

40 [0054] La presente descripción también se refiere a polinucleótidos obtenidos por (a) hibridación de una población de ADN en condiciones bajas, medias, medio altas, o muy altas de astringencia con (i) la secuencia nucleótida que codifica la defensina madura contenida en la SEC ID NO:1, SEC ID NO:3, SEC ID NO:5, SEC ID NO:7, SEC ID NO:9, SEC ID NO:11, SEC ID NO:13 o SEC ID NO:15, (ii) la secuencia de ADNc contenida en la SEC ID NO:1, SEC ID NO:3, SEC ID NO:5, SEC ID NO:7, SEC ID NO:9, SEC ID NO:11, SEC ID NO:13 o SEC ID NO:15, o (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii), y (b) aislando el polinucleótido de hibridación, que codifica un polipéptido con actividad antimicrobiana.

45 Constructos de ácido nucleico

50 [0055] La presente divulgación también se refiere a constructos de ácido nucleico comprendiendo un polinucleótido que codifica una defensina operativamente ligada a una o más secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada en condiciones compatibles con las secuencias de control.

55 [0056] Un polinucleótido que codifica una defensina se puede manipular de una variedad de formas para proporcionar una expresión de la defensina. La manipulación de la secuencia del polinucleótido antes de su inserción en un vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para modificar secuencias polinucleótidas utilizando métodos de ADN recombinante se conocen bien en la técnica.

60 [0057] La secuencia de control puede ser una secuencia de promotor apropiada, una secuencia nucleótida que reconoce una célula huésped para la expresión de un polinucleótido que codifica una defensina. La secuencia del promotor contiene secuencias de control transcripcionales que median la expresión de la defensina. El promotor puede ser cualquier secuencia nucleótida que muestre 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 [0058] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácido nucleico en una célula huésped filamentosa fúngica son promotores obtenidos a partir de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*,
 10 proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, alfa-amilasa estable en ácido de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger* o *Aspergillus awamori* (glaA), lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*, acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, amiloglucosidasa de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), *Fusarium venenatum* Daria (WO 00/56900), *Fusarium venenatum* Quinn (WO 00/56900), Proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa I de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa IV de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, xilanasa I de *Trichoderma reesei*, xilanasa II de *Trichoderma reesei*, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei*, al igual que el promotor NA2-tpi (un híbrido de los promotores de los genes para alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*), y, promotores mutantes, truncados, e híbridos de los mismos.

15 [0059] La secuencia de control también puede ser una secuencia terminadora de transcripción adecuada, una secuencia reconocida por una célula huésped para terminar la transcripción. La secuencia terminadora está operativamente enlazada al terminal 3' de la secuencia nucleótida que codifica la defensina. Se puede utilizar en la presente invención cualquier terminador que sea funcional en la célula huésped de elección.

20 [0060] Los terminadores preferidos para células huésped filamentosas fúngicas se obtienen a partir de los genes para TAKA amilasa 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*.

25 [0061] La secuencia de control también puede ser una secuencia guía adecuada, una región no traducida de un ARNm que es importante para la traducción por la célula huésped. La secuencia guía está operativamente unida al terminal 5' de la secuencia nucleótida que codifica la defensina. En la presente invención se puede utilizar cualquier secuencia guía que sea funcional en la célula huésped de elección.

30 [0062] Guías preferidas para células huésped filamentosas fúngicas se obtienen a partir de genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

35 [0063] La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia operativamente ligada a la terminal 3' de la secuencia nucleótida y que, cuando se transcribe, es reconocida por la célula huésped como una señal para añadir residuos de poliadenosina a ARNm transcrito. En la presente invención se puede utilizar cualquier secuencia de poliadenilación que sea funcional en la célula huésped de elección.

40 [0064] Secuencias de poliadenilación preferidas para células huésped filamentosas fúngicas se obtienen a partir de los genes para TAKA amilasa 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*.

45 [0065] La secuencia de control también puede ser una región de codificación de péptido señal que codifica para una secuencia de aminoácidos enlazada con la terminal de amino de una defensina y dirige la defensina codificada en la vía secretora de la célula. El terminal 5' de la secuencia codificante de la secuencia nucleótida puede contener intrínsecamente una región de codificación de péptido señal naturalmente unida en el marco de lectura de traducción con el segmento de la región de codificación que codifica la defensina secretada. Alternativamente, el terminal 5' de la secuencia codificante puede contener una región de codificación de péptido señal que es foránea a la secuencia codificante. La región de codificación de péptido señal foránea puede ser requerida dónde la secuencia codificante no contenga naturalmente una región de codificación de péptido señal. Alternativamente, la región de codificación de péptido señal foránea puede simplemente reemplazar la región de codificación de péptido señal natural para aumentar la secreción de la defensina. No obstante, en la presente invención se puede utilizar cualquier región de codificación de péptido señal que dirija las defensinas expresadas a la vía secretora de una célula huésped de elección.

55 [0066] Regiones de codificación de péptido señal eficaces para células huésped filamentosas fúngicas son las regiones de codificación de péptido señal obtenidas a partir de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, amilasa neutra de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, celulasa de *Humicola insolens*, y lipasa de *Humicola lanuginosa*.

60 [0067] En un aspecto preferido, la región de codificación de péptido señal son los nucleótidos 1 a 69 de la SEC ID NO:1 que codifican los aminoácidos -55 a -33 de la SEC ID NO:2, nucleótidos 1 a 60 de la SEC ID NO:3 que codifican los aminoácidos -48 a -29 de la SEC ID NO:4, nucleótidos 1 a 60 de la SEC ID NO:5 que codifican los aminoácidos -50 a -31 de

la SEC ID NO:6, nucleótidos 1 a 66 de la SEC ID NO:7 que codifican los aminoácidos -22 a -1 de la SEC ID NO:8, nucleótidos 1 a 72 de la SEC ID NO:9, que codifican los aminoácidos -24 a -1 de la SEC ID NO:10, nucleótidos 1 a 66 de la SEC ID NO:11 que codifican los aminoácidos -22 a -1 de la SEC ID NO:12, nucleótidos 1 a 66 de la SEC ID NO:13 que codifican los aminoácidos -22 a -1 de la SEC ID NO:14, o nucleótidos 1 a 54 de la SEC ID NO:15 que codifican los aminoácidos -26 a -9 de la SEC ID NO:16.

[0068] La secuencia de control también puede ser una región de codificación de propéptido que codifica para una secuencia de aminoácidos situada en el amino terminal de un polipéptido. El polipéptido resultante es conocido como un propolipéptido (o un zimógeno en algunos casos). Un propolipéptido es generalmente inactivo y puede ser convertido en un polipéptido maduro activo por escisión catalítica o autocatalítica del propéptido a partir del propolipéptido. La región de codificación de propéptido se puede obtener a partir de los genes para proteasa alcalina de *Bacillus subtilis* (aprE), proteasa neutra de *Bacillus subtilis* (nprT), alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, y lacasa de *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836).

[0069] En un aspecto preferido, la región de codificación de propéptido son nucleótidos 70 a 165 de la SEC ID NO:1 que codifica aminoácidos -32 a -1 de la SEC ID NO:2, nucleótidos 61 a 144 de SEC ID NO:3 que codifica aminoácidos -28 a -1 de la SEC ID NO:4, nucleótidos 61 a 150 de la SEC ID NO:5 que codifica aminoácidos -30 a -1 de la SEC ID NO:6 o nucleótidos 55 a 78 de la SEC ID NO:15 que codifica aminoácidos -8 a -1 de la SEC ID NO:16.

[0070] En el lugar en el que ambas regiones de péptido señal y de propéptido están presentes en el amino terminal de un polipéptido, la región de propéptido está situada junto al amino terminal de un polipéptido y la región de péptido señal está situada junto al terminal de amino de la región de propéptido.

[0071] También puede ser deseable añadir secuencias reguladoras que permitan la regulación de la expresión de la defensina en relación al crecimiento de la célula huésped. Ejemplos de sistemas reguladores son aquellos que causan que la expresión del gen sea encendida o apagada en respuesta a un estímulo físico o químico, incluyendo la presencia de un compuesto regulador. Sistemas reguladores en sistemas procarióticos incluyen los sistemas operadores lac, tac, y trp. En levadura, se pueden utilizar el sistema ADH2 o el sistema GAL1. En los hongos filamentosos se pueden utilizar como secuencias reguladoras, el promotor TAKA de alfa amilasa, el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger*, y el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae*. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son aquellas que permiten la amplificación génica. En sistemas eucarióticos, estos incluyen el gen de reductasa dihidrofolato que se amplifica en presencia de metotrexato, y los genes de metalotioneína que se amplifican con metales pesados. En estos casos, la secuencia nucleótida que codifica la defensina podría ser operativamente ligada con la secuencia reguladora.

35 Vectores de expresión

[0072] La presente divulgación también se refiere a vectores de expresión recombinantes comprendiendo un polinucleótido que codifica una defensina, un promotor, y señales de parada traduccionales y transcripcionales. Los varios ácidos nucleicos y secuencias de control anteriormente descritas pueden juntarse para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o sustitución de la secuencia nucleótica que codifica las defensinas en estos sitios. Alternativamente, una secuencia nucleótida que codifica una defensina se puede expresar por inserción de la secuencia nucleótida o un constructo de ácido nucleico comprendiendo la secuencia en un vector apropiado para la expresión. En la creación el vector de expresión, la secuencia codificante se localiza en el vector de modo que la secuencia codificante está operativamente unida con las secuencias de control apropiadas para la expresión.

[0073] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (p. ej., un plásmido o virus) que puede ser convenientemente sometido a procedimientos recombinantes de ADN y puede ocasionar la expresión de la secuencia nucleótida. La elección del vector depende típicamente de la compatibilidad del vector con la célula huésped en la que debe ser introducido el vector. Los vectores pueden ser plásmidos lineales o circulares cerrados.

[0074] El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, 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 uno que, cuando se introduce en la célula huésped, se integra en el genoma y se replica junto con el cromosoma(s) en el que ha sido integrado. Se pueden utilizar además, un único vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el total del ADN a ser introducido en el genoma de la célula huésped, o un transposón.

[0075] Los vectores usados para la expresión de las defensinas contienen preferiblemente uno o más marcadores seleccionables que permiten una selección fácil de células transformadas. Un marcador seleccionable es un gen cuyo

producto proporciona resistencia biocida o vírica, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos, y similares.

[0076] Ejemplos de marcadores seleccionables para uso en una célula huésped filamentosa fúngica incluyen, pero no se limitan a, amdS (acetamidasa), argB (ornitina-carbamoiltransferasa), bar (fosfonitricina acetiltransferasa), hph (higromicina fosfotransferasa), niaD (nitrato-reductasa), pyrG (orotidina-5'-fosfato-decarboxilasa), sC (adeniltransferasa de sulfato), y trpC (sintasa de antranilato), al igual que equivalentes de los mismos. Para uso en una célula de *Aspergillus* se prefieren los genes amdS y pyrG de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y el gen bar de *Streptomyces higroscopicus*.

[0077] Los vectores contienen preferiblemente un elemento(s) que permite la integración del vector en el genoma de la célula huésped o la replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.

[0078] Para la integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede depender de la secuencia polinucleótida que codifica la defensina o cualquier otro elemento del vector para la integración en el genoma por recombinación homóloga o no homóloga. Alternativamente, el vector puede contener secuencias nucleótidas adicionales para dirigir la integración por recombinación homóloga en el genoma de la célula huésped en lugar(es) precisos en el cromosoma(s). Para aumentar la probabilidad de integración a una ubicación precisa, los elementos integracionales deberían contener preferiblemente un número suficiente de ácidos nucleicos, tal como de 100 a 10,000 pb, preferiblemente de 400 a 10,000 pb, y de la forma más preferible de 800 a 10,000 pb, que tienen un alto grado de identidad con la secuencia objetivo correspondiente para mejorar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos integracionales pueden ser cualquier secuencia que sea homóloga con la secuencia objetivo en el genoma de la célula huésped. Además, los elementos integracionales pueden ser secuencias nucleótidas no codificantes o codificantes. Por otro lado, el vector puede estar integrado en el genoma de la célula huésped por recombinación no homóloga.

[0079] 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. El origen de replicación puede ser cualquier replicador plásmido que medie la replicación autónoma que funciona en una célula. El término "origen de replicación" o "replicador plásmido" se define aquí como una secuencia nucleótida que permite que un plásmido o vector se replique in vivo.

[0080] Ejemplos de orígenes de replicación útiles en una célula fúngica filamentosa son AMA1 y ANS1 (Gems y colaboradores, 1991, *Gene* 98:61-67, Cullen y colaboradores, 1987, *Nucleic Acids Research* 15: 9163-9175, WO 00/24883). El aislamiento del gen AMA1 y la construcción de plásmidos o vectores comprendiendo el gen, se puede realizar según los métodos divulgados en el documento WO 00/24883.

[0081] En la célula huésped se puede insertar más de una copia de un polinucleótido que codifica una defensina para aumentar la producción del producto genético. Un aumento en el número de copias del polinucleótido se puede obtener integrando al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped o incluyendo un gen marcador seleccionable amplificable con el polinucleótido donde las células con copias amplificadas del gen marcador seleccionable, y con ello copias adicionales del polinucleótido, se pueden seleccionar cultivando las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

[0082] Los procedimientos usados para unir los elementos descritos anteriormente para construir los vectores de expresión recombinante son conocidos por un experto en la materia (ver, por ejemplo, Sambrook y colaboradores., 1989, supra).

Células huésped

[0083] La célula huésped (u organismo) de la invención es una célula de una especie de *Aspergillus*. En una forma de realización más preferida, la célula huésped fúngica filamentosa es una *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*. En una forma de realización particular la célula huésped filamentosa es una *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus niger*.

[0084] En una forma de realización preferida de la invención la célula huésped es una cepa carente de proteasa o cepa de proteasa negativa.

[0085] Esta puede ser por ejemplo la cepa carente de proteasa *Aspergillus oryzae* JaL 125 con el gen de proteasa alcalina llamado "alp" eliminado. Esta cepa se describe en el documento WO 9735956 (NOVO NORDISK A/S) 02/10/1997, o el documento EP 429490 (GENENCOR) 05/06/1991, o la célula huésped libre de TPAP, en particular una cepa de *Aspergillus niger*, divulgado en el documento WO 9614404 (NOVO NORDISK A/S) 17/05/1996. Además, también las células huésped, especialmente *A. niger* o *A. oryzae*, con producción reducida del activador transcripcional (prtT) como se describe en el documento WO 0168864 (NOVOZYMES A/S) 20/09/2001 es específicamente contemplado según la invención.

Intrones

5 [0086] Los genes eucariotas pueden estar interrumpidos por secuencias interventoras (intrones) que deben ser modificadas en transcripciones precursoras para producir ARNm's funcionales. Este proceso de eliminación de intrones se conoce como empalme de pre ARNm. Normalmente, se necesita una secuencia de punto de bifurcación de un intrón para empalmar intrones a través de la formación de un lazo. Las señales para el empalme residen directamente en los bordes de los sitios de unión del intrón. Los bordes de los puntos de unión de intrón tienen normalmente las secuencias consenso de intrón GT y AG en sus extremidades 5' y 3', respectivamente. Mientras no se han divulgado puntos de unión 3' diferentes de AG, hay noticias de varias excepciones referentes al punto de unión 5'. Por ejemplo, hay precedentes en los que CT o GC se sustituyen por GT en el borde 5'. También hay una fuerte preferencia por las bases nucleótidas ANG T para seguir a GT donde N es A, C, G, o T (principalmente A o T en las especies de *Saccharomyces*), pero no hay una preferencia marcada por ningún nucleótido en particular para preceder al punto de unión GT. El punto de empalme 3' AG está principalmente precedido por una base de nucleótido de pirimidina (Py), es decir, C o T.

15 [0087] El número de intrones que pueden interrumpir un gen fúngico varía de uno a dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce o más intrones. Éstos pueden estar distribuidos por un gen o situados hacia los extremos 5' o 3' de un gen. En *Saccharomyces cerevisiae*, los intrones se localizan principalmente en el extremo 5' del gen. Los intrones tienen generalmente un tamaño inferior a 1 kb, y normalmente son inferiores a 400 pb en tamaño en la levadura e inferiores a 100 pb en hongos filamentosos.

20 [0088] La secuencia de punto de bifurcación del intrón de *Saccharomyces cerevisiae* 5'-TACTAAC-3' raramente aparece exactamente en intrones filamentosos fúngicos. Tramos de secuencias cercanas o aproximadamente similares a TACTAAC se ven en puntos equivalentes en intrones filamentosos fúngicos con un consenso general NRCTRAC donde N es A, C, G, o T, y R es A o G. Por ejemplo, la cuarta posición T es invariable en ambas secuencias consenso putativas de *Neurospora crassa* y de *Aspergillus nidulans*. Además, los nucleótidos G, A y C predominan en más del 80% de las posiciones 3, 6, y 7, respectivamente, aunque la posición 7 en *Aspergillus nidulans* es más flexible con sólo un 65% de C. No obstante, las posiciones 1, 2, 5, y 8 son mucho menos estrictas en ambas, *Neurospora crassa* y *Aspergillus nidulans*. Otros hongos filamentosos tienen tramos de punto de bifurcación similares en posiciones equivalentes en sus intrones, pero el muestreo es demasiado pequeño para discernir cualquier tendencia definida.

Métodos y usos

35 [0089] En un primer aspecto la presente invención proporciona una célula huésped recombinante de *Aspergillus*, comprendiendo un constructo de ácido nucleico, comprendiendo dicho constructo de ácido nucleico una secuencia de ácido nucleico foránea que codifica una defensina de insecto y una o más secuencia(s) de intrón. El término "secuencia de ácido nucleico foránea" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que ha sido introducida desde el exterior (desde una fuente foránea).

40 [0090] La célula huésped de *Aspergillus* puede ser capaz de expresar (producir) la defensina de insecto en una cantidad de al menos un 150%, preferiblemente de un 200%, más preferiblemente de un 250%, y de la forma más preferible de un 300% de la cantidad obtenida cuando se usa un constructo de ácido nucleico sin una secuencia de intrón, tal como una secuencia de ADNc.

45 [0091] La célula huésped de *Aspergillus* se puede cultivar en un medio de cultivo YPM durante 3-5 días a 30-35 grados Celsius bajo agitación adecuada. Éste y otros métodos adecuados para cultivar hongos filamentosos son bien conocidos en la técnica. La célula huésped de *Aspergillus* se puede usar para la producción recombinante de defensinas de insecto.

50 [0092] En un segundo aspecto la invención proporciona un método para la producción recombinante de una defensina de insecto en una célula huésped de *Aspergillus*, que incluye el cultivo de la célula huésped de *Aspergillus* comprendiendo un constructo de ácido nucleico, comprendiendo dicho constructo de ácido nucleico una secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido de defensina de insecto y una o más secuencia(s) de intrón, y recuperación del péptido de defensina de insecto. Métodos de recuperación adecuados son bien conocidos en la técnica.

55 [0093] La invención también se refiere al uso de un constructo de ácido nucleico comprendiendo una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de defensina de insecto y una o más secuencia(s) de intrón, para mejorar el nivel de expresión recombinante de la defensina de insecto en una célula huésped de *Aspergillus*.

60 [0094] El nivel de expresión de la defensina de insecto puede ser al menos un 50% más alto, preferiblemente al menos un 75% más alto, más preferiblemente al menos un 100% más alto, incluso más preferiblemente al menos un 125% más alto, de la forma más preferible un 150% más alto, y en particular un 200% más alto en comparación con el uso de un constructo

de ácido nucléico que no comprende una secuencia de intrón, tal como una secuencia de ADNc. Alternativamente, el nivel de expresión de la defensina de insecto puede ser de al menos 150%, preferiblemente de 200%, más preferiblemente de 250%, y de la forma más preferible de 300% del nivel de expresión obtenido cuando se usa un constructo de ácido nucleico sin secuencia de intrón, tal como una secuencia de ADNc. El nivel de expresión se mide en gramo de proteína de defensina de insecto por litro de fluido de fermentación.

[0095] En una forma de realización, el constructo de ácido nucléico contiene 1, 2, 3, 4, o 5 secuencia(s) de intrón, preferiblemente 1, 2, 3 o 4 secuencia(s) de intrón, más preferiblemente 1, 2 o 3 secuencia(s) de intrón, incluso más preferiblemente 1 o 2 secuencia(s) de intrón, y de la forma más preferible una secuencia de intrón.

[0096] En otra forma de realización, el constructo de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucléico que codifica un péptido de defensina y al menos uno, preferiblemente al menos dos, más preferiblemente al menos tres, y de la forma más preferible al menos cuatro secuencias de intrón.

[0097] La secuencia(s) de intrón puede estar localizada en la parte de codificadora del péptido señal, pro- o maduro del constructo de ácido nucleico. Cuando el constructo de ácido nucleico contiene más de un intrón, los intrones pueden estar localizados en diferentes partes del constructo.

[0098] La secuencia(s) de intrón puede situarse de hecho en cualquier parte del gen de defensina de insecto que se transcribe en ARNm.

Formulaciones farmacéuticas

[0099] Las defensinas de esta invención se pueden incorporar en una variedad de formulaciones farmacéuticas para administración terapéutica. Más particularmente, las defensinas se pueden formular en composiciones farmacéuticas en combinación con portadores o diluyentes apropiados farmacéuticamente aceptables, y se pueden formular en preparaciones en formas sólidas, semisólidas, líquidas o gaseosas, tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, cremas, espumas, soluciones, supositorios, inyecciones, inhalantes, geles, microesferas, lociones, y aerosoles. Como tal, la administración de las defensinas se puede lograr de varias maneras, incluyendo la administración oral, bucal, rectal, parenteral, intraperitoneal, intradérmica, transdérmica, endotraqueal, etc., las defensinas son sistémicas después de la administración.

[0100] Las defensinas se pueden administrar solas, en combinación con cualquier otra, o se pueden usar en combinación con otros compuestos conocidos (p. ej., perforina, agentes antiinflamatorios, antibióticos, etc.). En formas de dosificación farmacéuticas, las defensinas se pueden administrar en forma de sus sales farmacéuticamente aceptables. Los siguientes métodos y excipientes son meramente ilustrativos y no son limitativos de ninguna manera.

[0101] Para preparaciones orales, las defensinas se pueden usar solas o en combinación con aditivos apropiados para hacer comprimidos, polvos, gránulos o cápsulas, por ejemplo, con aditivos convencionales, tales como lactosa, manitol, almidón de maíz o almidón de patata, con aglutinantes, tales como celulosa cristalina, derivados químicos de la celulosa, acacia, almidón de maíz o gelatinas, con desintegradores, tales como almidón de maíz, almidón de patata o carboximetilcelulosa sódica, con lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio, y si se desea, con diluyentes, agentes amortiguadores, agentes de humedecimiento, y agentes conservantes y aromatizantes.

[0102] Las defensinas se pueden formular en preparaciones para inyecciones por disolución, suspensión o emulsión de éstas en un solvente acuoso o no acuoso, tal como aceites vegetales u otros aceites similares, glicéridos ácidos alifáticos sintéticos, ésteres de ácidos alifáticos más altos o propilenglicol, y si se desea, con aditivos convencionales tales como solubilizantes, agentes isotónicos, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, estabilizadores y conservantes.

[0103] Las defensinas se pueden utilizar en formulaciones de aerosol para ser administradas vía inhalación. Las defensinas se pueden formular en propulsores presurizados aceptables tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares.

[0104] Además, las defensinas se pueden hacer en forma de supositorios mediante la mezcla con una variedad de bases tales como bases emulsionantes o bases hidrosolubles. Las defensinas se pueden administrar por vía rectal vía un supositorio. El supositorio puede incluir excipientes tales como manteca de cacao, carboceras y glicoles de polietileno, que se funden a temperatura corporal, sin embargo se solidifican a temperatura ambiente.

[0105] Las formas de dosificación unitaria para la administración rectal u oral, tales como jarabes, elixires, y suspensiones pueden proporcionarse de tal forma que cada unidad de dosificación, por ejemplo, cucharadita, cucharada, pastilla o supositorio, contiene una cantidad predeterminada de la composición con una o más defensinas. De forma similar, las

formas de dosificación unitaria para inyección o administración intravenosa pueden comprender las defensinas en una composición como una solución en agua estéril, solución salina normal u otro portador farmacéuticamente aceptable.

[0106] El término "forma de dosificación unitaria", como se utiliza en este caso, se refiere a unidades físicamente aisladas adecuadas como dosificaciones unitarias para individuos humanos y animales, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de defensinas calculada en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado en asociación con un diluyente, portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Las especificaciones para las formas de dosificación unitaria dependen de la defensina en particular empleada y del efecto que se quiere lograr, y la farmacodinamia asociada a la defensina en el huésped.

[0107] Los excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como vehículos, adyuvantes, portadores o diluyentes, están fácilmente disponibles para el público. Por otra parte, las sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, tales como agentes ajustadores del pH y amortiguadores, agentes de tonicidad, estabilizadores, agentes de humidificación y similares, están fácilmente disponibles para el público.

[0108] Las dosificaciones típicas para la administración sistémica varían de 0.1 pg a 100 miligramos por kg de peso del sujeto por administración. Una dosificación típica puede ser una pastilla tomada de dos a seis veces diarias, o una cápsula de liberación temporal o pastilla tomada una vez al día y con un contenido proporcionalmente más alto de sustancia activa. El efecto de liberación temporal se puede obtener con materiales de cápsula que se disuelven con diferentes valores de pH, con cápsulas de liberación lenta o por presión osmótica, o por cualquier otro medio de liberación controlada conocido.

[0109] Los expertos apreciarán fácilmente que los niveles de dosificación pueden variar como funcionamiento de la defensina específica, la gravedad de los síntomas y la susceptibilidad del sujeto a efectos secundarios. Algunas de las defensinas específicas son más potente que otras. Las dosificaciones preferidas para una defensina dada son fácilmente determinables por los expertos en la técnica por una variedad de medios. Un medio preferido es la medición de la capacidad fisiológica de una defensina dada.

[0110] El uso de liposomas como vehículo de entrega es un método de interés. Los liposomas se funden con las células del sitio objetivo y liberan el contenido del lumen intracelularmente. Los liposomas se mantienen en contacto con las células durante el tiempo suficiente para la fusión, usando varios medios para mantener el contacto, tales como aislamiento, agentes aglutinantes, y similares. En un aspecto, los liposomas están diseñados para ser aerosolizados para la administración pulmonar. Los liposomas se pueden preparar con proteínas o péptidos purificados que median la fusión de membranas, tales como el virus Sendai o el virus de la gripe, etc. Los lípidos pueden ser cualquier combinación útil de lípidos que forman liposomas conocidos, incluyendo lípidos catiónicos o zwitteriónicos, tales como fosfatidilcolina. Los lípidos restantes serán normalmente lípidos neutros o ácidos, tales como colesterol, fosfatidil serina, fosfatidil glicerol, y similares.

[0111] Para preparar los liposomas, puede ser utilizado el procedimiento descrito por KATO. *Expression of hepatitis B virus surface antigen in adult rat liver. Co-introduction of DNA and nuclear protein by a simplified liposome method. J. biol. chem., uaryFebr* vol. 266, p. 3361-3364. ISSN 0021-9258 Brevemente, la composición de lípidos y lumen con péptidos se combinan en un medio acuoso apropiado, convenientemente un medio de solución salina donde el total de los sólidos totales estará en el intervalo de aproximadamente 1-10 por ciento en peso. Después de intensa agitación durante breves periodos de tiempo, de aproximadamente 5-60 seg., el tubo se coloca en un baño de agua caliente, de aproximadamente 25-40°C y este ciclo se repite aproximadamente 5-10 veces. La composición se somete luego a sonicación durante un periodo de tiempo conveniente, generalmente de aproximadamente 1-10 seg., y puede ser agitada de nuevo por agitación de vórtice. A continuación se expande el volumen añadiendo medio acuoso, aumentando generalmente el volumen en aproximadamente 1-2 pliegues, seguido de agitación y enfriamiento. Este método permite la incorporación de moléculas de alto peso molecular en el lumen.

50 Formulaciones con otros agentes activos

[0112] Para uso en el método objeto, las defensinas se pueden formular con otros agentes farmacéuticamente activos (tales como esteroides), que son bien conocidos en la técnica, particularmente otros agentes antimicrobianos. Otros agentes de interés incluyen una amplia variedad de antibióticos, como se conoce en la técnica. Las clases de antibióticos incluyen penicilinas, por ejemplo, penicilina G, penicilina V, meticilina, oxacilina, carbenicilina, nafcilina, ampicilina, etc., penicilinas en combinación con inhibidores de beta lactamasa, cefalosporinas, por ejemplo, cefaclor, cefazolina, cefuroxima, moxalactamo, etc., carbapenems, monobactams, aminoglicósidos, tetraciclina, macrólidos, lincomicinas, polimixinas, sulfonamidas, quinolonas, cloranfenicol, metronidazol, espectinomocina, trimetoprima, vancomicina, etc.

[0113] También son útiles los agentes antimicóticos, incluyendo polienos, por ejemplo, anfotericina B, nistatina, 5-flucitosina, y azoles, por ejemplo miconazol, ketoconazol, itraconazol y fluconazol. Los fármacos antituberculóticos incluyen isoniazida,

etambutol, estreptomycin y rifampicina. También se pueden incluir en una formulación de las defensinas de la invención citoquinas, por ejemplo interferón gamma, factor de necrosis tumoral alfa, interleuquina 12, etc.

[0114] La presente invención se describe a continuación con más detalle con los siguientes ejemplos que no deberían ser interpretados como limitativos del campo de la invención.

Ejemplos

[0115] Los productos químicos usados como tampones y sustratos fueron productos comerciales de al menos grado reactivo.

Ejemplo 1

Expresión de secuencia codificante de defensina con intrón en *Aspergillus oryzae*

[0116] Se clonó el producto de PCR digerido 361 pb BamH1-Xho1 amplificado a partir de una genoteca de ADNc de *P. nigrella* (SEC ID NO:6 del documento WO 03044049 (NOVOZYMES A/S) 2003/05/30) en un vector de expresión de *Aspergillus* como previamente descrito en el documento WO 03/044049, para dar el plásmido pMT2549. La secuencia del intrón en la secuencia codificante de plectasina de pMT2549 se modificó utilizando mutagénesis estándar in vitro y SOE para introducir una base extra individual creando así un punto de restricción en el intrón. La secuencia codificante de plectasina resultante con contenido de intrón (59 pb) se muestra como SEC ID NO:17. El plásmido de expresión correspondiente fue denominado pMT2647.

[0117] El pMT2647 se transformó en *Aspergillus oryzae* BECh2 tal y como se describe anteriormente en el documento WO 03/044049. En primer lugar, se realsaron dos veces 14 transformantes individuales, se cultivaron en medio YPM (1% de extracto de levadura, 2% de bactopectona y 2% de maltosa) y finalmente se analizaron muestras de 10 µL en geles SDS como se describe previamente en el documento WO 03/044049. En algunos de los transformantes la cantidad de plectasina producida a partir de las intensidades de coloración traspasa considerablemente el nivel máximo estimado de 50 mg/L obtenido previamente en esas condiciones de cultivo para transformantes de *A. oryzae* con el plásmido de expresión codificando la plectasina que codifica el ADNc libre de intrón (ver WO 03/044049).

[0118] Mientras varios de los 14 transformantes pMT2549 parecieron producir niveles más altos de plectasina de lo que lo hicieron los mejores de los 30 transformantes libres de intrón previamente analizados en el documento WO 03/044049, debe tenerse en cuenta que cualquier transformante de acetamida seleccionado representa una transformación e integración individual dando como resultado diferencias considerables en los rendimientos entre transformantes individuales. Tales diferencias de rendimiento se sabe que ocurren en sistemas basados en recombinación no homóloga, y son generalmente considerados como consecuencia del locus de integración aleatoria y el número de plásmido de expresión integrado. Se decidió por tanto comparar también la expresión de una sola copia de un vector de expresión integrado en un locus definido (véase ejemplo 2).

Ejemplo 2

Expresión de defensina en *Aspergillus oryzae* a partir de integrantes de una sola copia definidos.

[0119] Para comparar directamente la expresión en *A. oryzae* de plectasina de ADNc carente de intrón con la expresión de la secuencia codificante de plectasina con intrón, estos se transfirieron de pMT2548 (ver documento WO 03/044049) y pMT2549 (arriba), respectivamente, en fragmentos de aprox. 1.1 kb BamH1-Xba1 al fragmento BamH1-Xba1 de un vector basado en pJaL485 (8.3 kb). (véase ejemplo 3 en el documento WO 03008575 (NOVOZYMES A/S) 2003/01/30). El pJaL485 contiene para la selección solamente la parte del gen *A. oryzae* niaD que codifica la parte C-terminal de nitrato reductasa. Usando una cepa huésped tal como JaL507, un derivado de JaL294 (véase ejemplo 8 en el documento WO 03/008575) conteniendo una supresión en esta parte del gen niaD, puede reestablecerse una nitrato reductasa funcional, y así la capacidad para crecer en nitrato como fuente de nitrógeno, solamente por recombinación homóloga. Se ha descubierto que la mayoría de los transformantes seleccionados de esta manera son de hecho integrantes de una sola copia que resultan de un único cruce homólogo. Los integrantes en serie en el punto niaD se dan con menor frecuencia. Los plásmidos de expresión derivados de pJaL485 carentes de intrón y con intrón se denominaron pMT2777 y pMT2836, respectivamente. Se seleccionaron para cada uno de estos plásmidos 4 transformantes de *A. oryzae* JaL507 y el análisis Southern mostró que contenían una sola copia del plásmido transformante integrado de forma homóloga en el locus niaD. Los transformantes de *A. oryzae* derivados de pMT2777 se denominaron MT2882-2885 y los transformantes derivados de pMT2836, MT2886-2889. Cada uno de los transformantes MT2882-2889 se cultivaron en YPM como se ha descrito anteriormente y se analizaron muestras de 10 µL de sobrenadante de cultivo después de 3 y después de 7 días de cultivo mediante geles de SDS PAGE como anteriormente. El resultado mostró claramente muy poca diferencia entre los

transformantes con cada plásmido (como previsto, ya que éstas debían ser cepas independientes pero idénticas). Por otro lado, es evidente que el nivel de expresión en MT2886-2889 (con contenido de intrón) es superior que en MT2882-2885 (carente de intrón).

- 5 [0120] Los niveles comparativos de plectasina de las muestras del día 7 de MT2882-2889 también se determinaron con un ensayo ELISA (véase ejemplo 4).

Ejemplo 3

10 Expresión aumentada de defensina de genes con intrón en diferente posición y/o diferente intrón

[0121] Para facilitar la transferencia de secuencias que codifican variantes de plectasina, de por ejemplo *E. coli* y vectores de *S. cerevisiae* a vectores de expresión de *Aspergillus*, se decidió trasladar el intrón de plectasina de su posición original situada en la secuencia codificante de plectasina madura a una posición en la secuencia codificante del prepro péptido. Para hacer esto, se introdujeron mutaciones en la secuencia codificante de plectasina carente de intrón por mutagénesis in vitro dando como resultado un punto MluN1 siendo localizado en la secuencia codificante del péptido señal. Sólo fue posible introducir el punto MluN1 al permitir un cambio de aminoácido en el péptido señal (Leu17 cambió a Ala). Este cambio de aminoácido no está previsto que perjudique a la función del péptido señal según programas de predicción de señal comúnmente usados. La secuencia de la secuencia codificante de plectasina del MluN 1 carente de intrón se muestra como SEC ID NO:18, el plásmido de expresión de *Aspergillus* correspondiente se denominó pMT2898.

[0122] Un intrón derivado del segundo intrón de glucoamilasa de *A. niger* y construido de manera que puede ser suprimido de un plásmido pMT2374 como un 55 pb SnaB1-Pvu2 (véase ejemplo 1 en el documento WO 03104457 (NOVOZYMES A/S) 2003/12/18) se insertó en el punto MluN de pMT2898 para dar pMT2899 en el que el intrón se verificó para ser insertado en la orientación apropiada. La secuencia de la secuencia codificante de plectasina con intrón de pMT2899 se muestra como SEC ID NO:19.

[0123] El intrón originalmente presente en la secuencia que codifica la plectasina madura también se hizo sintéticamente, de manera que éste podría asimismo moverse como un fragmento de SnaB1-Pvu2. Esto fue posible alterando sólo la última excepto dos bases del intrón de un T a un C. Este intrón también se trasladó al punto MluN1 de pMT2898 para dar un pMT2900 en el que la orientación de intrón correcta fue verificada por secuenciación. La secuencia de la secuencia codificante de plectasina con intrón de pMT2900 se muestra como SEC ID NO:20.

[0124] Los plásmidos pMT2898, 2899 y 2900 se transformaron en *A. oryzae* BECh 2 seleccionados para cultivo en acetamida. Se realsaron aproximadamente 20 transformantes con cada plásmido dos veces y se cultivaron en YPM como se ha descrito anteriormente. A partir de los geles SDS PAGE del sobrenadante se hizo evidente que el nivel de expresión de plectasina medio fue considerablemente superior en los transformantes con constructos con intrón pMT2899 y pMT2900 en comparación con el constructo carente de intrón pMT2898. Una vez más, puesto que los niveles de expresión entre transformantes individuales seleccionados de acetamida varía mucho, se decidió transferir los cassettes de expresión de MT2898-2900 al vector de expresión basado en niaD derivado de pJaL485 como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 2. Los plásmidos de expresión resultantes fueron pMT2901, pMT2902, y pMT2903 correspondiendo a pMT2898, pMT2899 y pMT2900, respectivamente. Los pMT2901-2903 se transformaron en el huésped defectivo niaD JaL507, como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 2. Se realsaron varios transformantes para cada una de las transformaciones. Los transformantes se cultivaron en YPM y el sobrenadante se dejó en geles page SDS como anteriormente. También en este caso es obvio que el nivel de expresión es más alto para los constructos con intrón pMT2902 y pMT2903 de lo que lo es para transformantes con el constructo pMT2901. Queda por demostrar por análisis Southern qué transformantes son de hecho integrantes de una sola copia, pero por experiencia, la mayoría de transformantes seleccionados a partir de nitrato en esta configuración puede demostrar que son integrantes de una sola copia, cuando se da integración en serie. Se seleccionaron dos transformantes como cepas representativas para cada uno de pMT2901(cepas MT2946 y MT2947), pMT2902 (cepas MT2948 y MT2949), y pMT2903 (cepas MT2952 y MT2953).

[0125] También se realizó cuantificación ELISA de plectasina para MT2946-2949 (véase ejemplo 4).

Ejemplo 4

55 Cálculo ELISA competitivo de rendimientos de plectasina en fermentaciones de *Aspergillus oryzae*

[0126] Usando un anticuerpo policlonal de conejo producido contra la plectasina purificada, se aplicó un ELISA competitivo indirecto para estimar los rendimientos en los caldos de fermentación de *Aspergillus oryzae*. Este tipo de ensayo es un procedimiento estándar aplicado generalmente para cuantificar cantidades de una proteína/péptido dado, suponiendo que se ha producido un antisuero.

[0127] Se utilizaron el siguiente material y tampones:

- 5 - plectasina - una defensiva descrita en la solicitud PCT del documento WO 03/044049,
- Placa F96 MaxiSorp (Nunc, Cat. n.º: 439454),
- Placa F96 Microwell (Nunc, Cat. n.º: 269787),
- Leche desnatada en polvo (MERCK, Cat. n.º: 1.15363.0500),

- 10 - Tween 20 (MERCK, Cat. n.º: 8.22184.0500),
- Plectasin specific rabbit polyclonal antibody (Novozymes),
- Swine Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP (DAKO, P0448),
- TMB plus, Ready-to-go (KemEnTek, gato. n.º: 4390),
- ácido sulfúrico (MERCK, Cat. n.º: 1.00731.1000),
- 15 - PBS, pH 7.2, 1L:
 - 8.00 g NaCl,
 - 0.20 g KCl,
 - 1.04 g K₂HPO₄,
 - 0.32 g KH₂PO₄,

- 20 - Tampón de bloqueo: PBS, 2 % leche desnatada,
- Tampón de lavado: PBS, 0.05% Tween 20,
- Tampón de dilución: PBS, 0.5 % leche desnatada, 0.05 % Tween 20.

25 [0128] En resumen, las diluciones de caldos de cultivo en serie no diluidas y a la mitad, se preincubaron con 1:1000 anticuerpos policlonales en el tampón de dilución. Tras incubación durante 2 horas a temperatura ambiente, estas muestras se transfirieron a placas preresvestidas de plectasina (revestidas con 0.1 µg/ml de plectasina y bloqueadas por unión residual utilizando tampón de bloqueo). Tras incubación durante 1 hora a temperatura ambiente, se detectó anticuerpo unido usando un anticuerpo secundario (cerdo anti-conejo- HRP) y luego un cromógeno (TMB Plus). La detección de anticuerpo unido de plectasina se midió a través de absorbencia a 450 nm, lo que dio como resultado una curva de titulación de unión de anticuerpo.

35 [0129] Durante el ensayo se lavaron las placas utilizando tampón de lavado y se hicieron diluciones de sustancia como descritas por el fabricante (DAKO & KemEnTek).

40 [0130] Interpretaciones: se ha dado la no detección de unión de anticuerpo por los medios de pocillo que completan la unión (inhibición) del anticuerpo al caldo de fermentación desconocido, mientras que la absorbencia máxima medida iguala la ausencia de inhibición por el competidor (caldo de fermentación desconocido). De esta manera seriamos capaces de estimar las cantidades (caldos diluidos) que se necesitarían para inhibir el 50% de la unión de los pocillos. Los resultados se representan en la tabla que aparece a continuación. Los resultados se calcularon con relación a los rendimientos medidos por los caldos de fermentación sin intrón (MT2882, MT2883, MT2884 y MT2885). Los resultados se muestran en la tabla 1.

45 [0131] Los resultados muestran que con el uso de constructos de genes con un intrón, los niveles de expresión se incrementaron en aprox. un 330% respecto de los niveles de expresión obtenidos con el uso de constructos sin intrón.

Tabla 1

| Intrón | Cultivo ID | rendimiento relativo | rendimiento medio |
|--------|---------------|----------------------|-------------------|
| - | MT2882, día 7 | 106 | 100 |
| - | MT2883, día 7 | 108 | |
| - | MT2884, día 7 | 96 | |
| - | MT2885, día 7 | 91 | |
| + | MT2886, día 7 | 335 | 330 |
| + | MT2887, día 7 | 368 | |
| + | MT2888, día 7 | 310 | |
| + | MT2889, día 7 | 320 | |
| - | MT2946 | 77 | 89 |
| - | MT2947 | 100 | |
| + | MT2948 | 268 | 331 |
| + | MT2949 | 394 | |

Ejemplo 5Expresión aumentada de defensina de *Eurotium Amstelodami*

5 [0132] Se identificó anteriormente un ADNc de codificación de defensina de *Eurotium amstelodami* y la defensina se denominó Eurocin (ver ejemplos de DK 2005/000725 (NOVOZYMES A/S) o SEC ID NO:3). El ADNc se expresó en *A. oryzae* para dar lugar al péptido de defensina Eurocin activo. Para aumentar el nivel de expresión, se hizo un constructo de expresión conteniendo la secuencia de ADN (incluyendo dos intrones).

10 [0133] El ADN genómico de *E. amstelodami* se preparó usando un método estándar para preparación de ADN genómico fúngico. Se utilizaron aproximadamente 50 ng de ADN genómico como patrón en una reacción de PCR con los siguientes cebadores.

[0134] Cebador A:

15 TCTTGGATCCACCATGCACTTCACCAAGGTCTCC (SEC ID NO:21)

[0135] Cebador B:

20 TCTTCTCGAGTTAGAAAGAACAGGTGCAGGTAC (SEC ID NO:22)

[0136] Se utilizaron 10 pmoles de cada cebador en un volumen de reacción de 50 µl. La temperatura de recocido fue de 55 grados Celsius y la extensión a 72 grados Celsius durante 1 minuto. Se realizaron un total de 35 ciclos usando el sistema Expand High Fidelity PCR (Roche). El producto de PCR se digirió con BamH1 y Xho1 que cortó las preponderancias introducidas por los cebadores de PCR. El digerido se introdujo en un gel de agarosa de 2% y se aisló una banda de aproximadamente 400 pb. La banda aislada se ligó en plásmido digerido pMT2786 BamH1-Xho1 (véase ejemplo 2 de PCT/DK2005/000725) y se transformó en *E. Coli* MT173 seleccionado para prototofía de leucina. El inserto BamH1-Xho1 se secuenció y mostró codificar la secuencia prepro-Eurocin correspondiente al ADNc previamente caracterizado (ver PCT/DK2005/000725 o SEC ID NO:3), pero también con dos secuencias de intrón de 45 y 53 bases, respectivamente. La secuencia y estructura del inserto BamH1-Xho1 se muestra en la SEC ID NO:23. El plásmido de expresión de *Aspergillus* con el inserto se denominó pMT2945.

[0137] El pMT2945 se transformó en *A. oryzae* BECh2 como se describe en el ejemplo 1, y se aislaron y fermentaron 20 transformantes como en el ejemplo 1. El sobrenadante se analizó en geles SDS, también como se ha descrito anteriormente. Como anteriormente, también se hicieron ensayos paralelos utilizando transformantes con el plásmido de expresión basado en ADNc de Eurocina pMT2935 (véase ejemplo 2 de PCT/DK2005/000725).

[0138] Los transformantes basados en el constructo de ADNc pMT2935 y el constructo con intrón pMT2945, produjeron todos bandas diferentes correspondiendo a Eurocin en tamaño en geles SDS.

[0139] En los transformantes basados en el constructo genómico pMT2945 se estimó un rendimiento de 300-400% del nivel de expresión obtenido con los transformantes basados en el constructo de ADNc pMT2935.

Ejemplo 6Uso de los ficheros HMM de la base de datos PFAM para identificar una defensina

[0140] El análisis de secuencias usando los perfiles de modelos ocultos de markov (perfiles HMM) se puede llevar a cabo bien online en Internet o localmente en un ordenador que usa el bien conocido paquete de software HMMER disponible gratuitamente. La versión actual es HMMER 2.3.2 de octubre de 2003.

[0141] Los perfiles HMM se pueden obtener de la bien conocida base de datos PFAM. La versión actual es PFAM 16.0 de noviembre de 2004. Ambos, HMMER y PFAM están disponibles para todas las plataformas de ordenador por ejemplo en la Universidad de Washington en San Luis (EEUU), School of Medicine (<http://pfam.wustl.edu> y <http://hmmmer.wustl.edu>).

[0142] Si una secuencia de aminoácidos en cuestión, o un fragmento de la misma, pertenece a una de las siguiente cinco familias PFAM, la secuencia de aminoácidos es una defensina según la presente invención:

- Defensina beta o, "beta defensina" número de acceso: PF00711,
- Defensina propep o, "defensina propéptido" número de acceso: PF00879,

- Defensina 1 o, "defensina de mamífero" número de acceso: PF00323,
- Defensina 2 o, "defensina de artrópodo" número de acceso: PF01097,
- Gamma-tionina o, "familia gamma tioninas" número de acceso: PF00304.

5 [0143] Según la presente invención una secuencia de aminoácidos pertenece a una familia PFAM, si ésta genera un valor E que es mayor que 0.1 y una puntuación que es mayor o igual a cero cuando la base de datos PFAM se usa online, o cuando el programa hmmpfam (del paquete de software HMMER) se usa localmente.

10 [0144] Cuando el análisis de secuencia se realiza localmente utilizando el programa "hmmpfam", es preciso obtener (descargar) los perfiles HMM de la base de datos PFAM. Existen dos perfiles para cada familia, "xxx-ls.hmm" para búsquedas globales, y "xxx fs.hmm" para búsquedas locales ("xxx" es el nombre de la familia). Esto hace un total de diez perfiles para las cinco familias mencionadas anteriormente.

15 [0145] Estos diez perfiles se pueden utilizar individualmente, o unidos (anexos) en un único perfil (usando un editor de texto - los perfiles son ficheros ASCII) que puede ser nombrado por ejemplo "defensin.hmm". Una secuencia de aminoácidos en cuestión puede ser evaluada por lo tanto utilizando la siguiente línea de comandos:

```
hmmpfam -E 0.1 defensin.hmm sequence_file
```

20 - donde "sequence_file" es un fichero con la secuencia de aminoácidos en cuestión en cualquiera de los formatos reconocidos por el paquete de software HMMER.

[0146] Si la puntuación es mayor o igual a cero (0.0), y el valor E es mayor que 0.1, la secuencia de aminoácidos en cuestión es una defensina según la presente invención.

25 [0147] La base de datos PFAM se describe más detalladamente en BATEMAN, *The Pfam Protein Families Database*. Nucleic acids res., ary Janu vol. 32, p. D138-D141. ISSN 0305-1048.

LISTADO DE SECUENCIAS

30 [0148]

<110> Novozymes A/S

35 <120> Expresión recombinante de defensinas en hongos filamentosos

<130> 10789.204-WO

<160> 24

40

<170> Versión patentIn 3.3

<210> 1

<211> 288

45

<212> ADN

<213> Pseudoplectania nigrella

<220>

<221> CDS

50

<222> (1)..(285)

<220>

<221> péptido señal

<222> (1) .. (69)

55

<220>

<221> péptido maduro

<222> (166)..(285)

60

<400> 1

ES 2 375 150 T3

| | |
|---|-----|
| atg caa ttt acc acc atc ctc tcc atc ggt atc acc gtc ttc gga ctt | 48 |
| Met Gln Phe Thr Thr Ile Leu Ser Ile Gly Ile Thr Val Phe Gly Leu | |
| -55 -50 -45 -40 | |
| | |
| ctc aac acc gga gcc ttt gca gca ccc cag cct gtt ccc gag gct tac | 96 |
| Leu Asn Thr Gly Ala Phe Ala Ala Pro Gln Pro Val Pro Glu Ala Tyr | |
| -35 -30 -25 | |
| | |
| gct gtt tct gat ccc gag gct cat cct gac gat ttt gct ggt atg gat | 144 |
| Ala Val Ser Asp Pro Glu Ala His Pro Asp Asp Phe Ala Gly Met Asp | |
| -20 -15 -10 | |
| | |
| gcg aac caa ctt cag aaa cgt gga ttt gga tgc aat ggt cct tgg gat | 192 |
| Ala Asn Gln Leu Gln Lys Arg Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp | |
| -5 -1 1 5 | |
| | |
| gag gat gat atg cag tgc cac aat cac tgc aag tct att aag ggt tac | 240 |
| Glu Asp Asp Met Gln Cys His Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr | |
| 10 15 20 25 | |
| | |
| aag gga ggt tat tgt gct aag ggg ggc ttt gtt tgc aag tgt tac tag | 288 |
| Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr | |
| 30 35 40 | |

5 <210> 2
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Pseudoplectania nigrella

10 <400> 2

ES 2 375 150 T3

Met Gln Phe Thr Thr Ile Leu Ser Ile Gly Ile Thr Val Phe Gly Leu
 -55 -50 -45 -40

Leu Asn Thr Gly Ala Phe Ala Ala Pro Gln Pro Val Pro Glu Ala Tyr
 -35 -30 -25

Ala Val Ser Asp Pro Glu Ala His Pro Asp Asp Phe Ala Gly Met Asp
 -20 -15 -10

Ala Asn Gln Leu Gln Lys Arg Gly Phe Gly Cys Asn Gly Pro Trp Asp
 -5 -1 1 5

Glu Asp Asp Met Gln Cys His Asn His Cys Lys Ser Ile Lys Gly Tyr
 10 15 20 25

Lys Gly Gly Tyr Cys Ala Lys Gly Gly Phe Val Cys Lys Cys Tyr
 30 35 40

- <210> 3
- <211> 273
- 5 <212> ADN
- <213> Eurotium amstelodami
- <220>
- <221> CDS
- 10 <222> (1)..(270)
- <220>
- <221> péptido señal
- <222> (1) .. (60)
- 15 <220>
- <221> péptido maduro
- <222> (145)..(270)
- 20 <400> 3

ES 2 375 150 T3

atg cac ttc acc aag gtc tcc acc att ctt ttt acc atc ttc gcc gcc 48
 Met His Phe Thr Lys Val Ser Thr Ile Leu Phe Thr Ile Phe Ala Ala
 -45 -40 -35

ggc atc atg gct gct ccc acc gaa gga gtc cgt gag gaa gcc gcc cct 96
 Gly Ile Met Ala Ala Pro Thr Glu Gly Val Arg Glu Glu Ala Ala Pro
 -30 -25 -20

ggc cag gag gtt tac ccc gac gaa cct cct gct tct ctg acc aag cgt 144
 Gly Gln Glu Val Tyr Pro Asp Glu Pro Pro Ala Ser Leu Thr Lys Arg
 -15 -10 -5 -1

ggc ttc gga tgt cct ggt gat gcc tac cag tgc agt gaa cac tgc agg 192
 Gly Phe Gly Cys Pro Gly Asp Ala Tyr Gln Cys Ser Glu His Cys Arg
 1 5 10 15

gcc ctg ggc ggt gga cgc act gga gga tac tgt gct gga cct tgg tat 240
 Ala Leu Gly Gly Gly Arg Thr Gly Gly Tyr Cys Ala Gly Pro Trp Tyr
 20 25 30

ttg ggt cac cct acc tgc acc tgt tct ttc taa 273
 Leu Gly His Pro Thr Cys Thr Cys Ser Phe
 35 40

<210> 4

5 <211> 90

<212> PRT

<213> Eurotium amstelodami

<400> 4

10

Met His Phe Thr Lys Val Ser Thr Ile Leu Phe Thr Ile Phe Ala Ala
 -45 -40 -35

Gly Ile Met Ala Ala Pro Thr Glu Gly Val Arg Glu Glu Ala Ala Pro
 -30 -25 -20

Gly Gln Glu Val Tyr Pro Asp Glu Pro Pro Ala Ser Leu Thr Lys Arg
 -15 -10 -5 -1

Gly Phe Gly Cys Pro Gly Asp Ala Tyr Gln Cys Ser Glu His Cys Arg
 1 5 10 15

Ala Leu Gly Gly Gly Arg Thr Gly Gly Tyr Cys Ala Gly Pro Trp Tyr
 20 25 30

Leu Gly His Pro Thr Cys Thr Cys Ser Phe
 35 40

ES 2 375 150 T3

5 <210> 5
 <211> 273
 <212> ADN
 <213> Picea glauca

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(270)

15 <220>
 <221> péptido señal
 <222> (1)..(60)

<220>
 <221> péptido maduro
 <222> (151)..(270)

20 <400> 5

atg aag ttc acc atc tcc atc atc gcc gct ctc gct ttc ttc gcc cag 48
 Met Lys Phe Thr Ile Ser Ile Ile Ala Ala Leu Ala Phe Phe Ala Gln

-50 -45 -40 -35

gga atc gtg gca gct cct gcg cct atc ccc gag gcc gcc gcg gtg gct 96
 Gly Ile Val Ala Ala Pro Ala Pro Ile Pro Glu Ala Ala Ala Val Ala
 -30 -25 -20

gcc cca gag gcc gag cca aag gcg tta gat gag ctt ccg gag ttg caa 144
 Ala Pro Glu Ala Glu Pro Lys Ala Leu Asp Glu Leu Pro Glu Leu Gln
 -15 -10 -5

aag cgt ggc ttt ggg tgc aac ggt tgg cct ttc gag gac gat gag cag 192
 Lys Arg Gly Phe Gly Cys Asn Gly Trp Pro Phe Glu Asp Asp Glu Gln
 -1 1 5 10

tgc cat aat cac tgc aag acc att cct ggt tat aag ggt ggc tac tgt 240
 Cys His Asn His Cys Lys Thr Ile Pro Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys
 15 20 25 30

gcc aac gtt ggc acc act tgc aag tgc tac tag 273
 Ala Asn Val Gly Thr Thr Cys Lys Cys Tyr
 35 40

25

30 <210> 6
 <211> 90
 <212> PRT
 <213> Picea glauca

<400> 6

35

ES 2 375 150 T3

Met Lys Phe Thr Ile Ser Ile Ile Ala Ala Leu Ala Phe Phe Ala Gln
 -50 -45 -40 -35

Gly Ile Val Ala Ala Pro Ala Pro Ile Pro Glu Ala Ala Ala Val Ala
 -30 -25 -20

Ala Pro Glu Ala Glu Pro Lys Ala Leu Asp Glu Leu Pro Glu Leu Gln
 -15 -10 -5

Lys Arg Gly Phe Gly Cys Asn Gly Trp Pro Phe Glu Asp Asp Glu Gln
 -1 1 5 10

Cys His Asn His Cys Lys Thr Ile Pro Gly Tyr Lys Gly Gly Tyr Cys
 15 20 25 30

Ala Asn Val Gly Thr Thr Cys Lys Cys Tyr
 35 40

- <210> 7
- <211> 189
- 5 <212> ADN
- <213> Crassostrea virginica

- <220>
- <221> CDS
- 10 <222> (1)..(186)

- <220>
- <221> péptido señal
- <222> (1) .. (66)
- 15

- <220>
- <221> péptido maduro
- <222> (67)..(186)

- 20 <400> 7

ES 2 375 150 T3

```

atg aaa gtg ttt gta ctt ctt aca ata gca gta atg ctt atg gta tct      48
Met Lys Val Phe Val Leu Leu Thr Ile Ala Val Met Leu Met Val Ser
      -20                      -15                      -10

gcc gac gtt gct ttg gcc ggc ttt ggc tgt cct ttg aac cgg tac cag      96
Ala Asp Val Ala Leu Ala Gly Phe Gly Cys Pro Leu Asn Arg Tyr Gln
      -5                      -1 1                      5                      10

tgt cac tca cat tgc caa tcc att ggt cgt aaa ggt gga tac tgt ggt      144
Cys His Ser His Cys Gln Ser Ile Gly Arg Lys Gly Gly Tyr Cys Gly
              15                      20                      25

ggg tgg tgg agt ttt aca tgc aca tgc tac cgc act aaa aag tag      189
Gly Trp Trp Ser Phe Thr Cys Thr Cys Tyr Arg Thr Lys Lys
              30                      35                      40

```

5 <210> 8
 <211> 62
 <212> PRT
 <213> Crassostrea virginica

<400> 8

10

```

Met Lys Val Phe Val Leu Leu Thr Ile Ala Val Met Leu Met Val Ser
      -20                      -15                      -10

Ala Asp Val Ala Leu Ala Gly Phe Gly Cys Pro Leu Asn Arg Tyr Gln
      -5                      -1 1                      5                      10

Cys His Ser His Cys Gln Ser Ile Gly Arg Lys Gly Gly Tyr Cys Gly
              15                      20                      25

Gly Trp Trp Ser Phe Thr Cys Thr Cys Tyr Arg Thr Lys Lys
              30                      35                      40

```

15 <210> 9
 <211> 189
 <212> ADN
 <213> Mesobuthus gibbosus

20 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(186)

25 <220>
 <221> péptido señal
 <222> (1) .. (72)

30 <220>
 <221> péptido maduro
 <222> (73)..(186)

ES 2 375 150 T3

<400> 9

5

```

atg aaa acc att gta ctt ctt ttc gtg ttg gct tta gta ttc tgc act      48
Met Lys Thr   Ile Val Leu Leu Phe Val Leu Ala Leu Val Phe Cys Thr
                -20                      -15                      -10

ctt gaa atg gga atg gtg gaa gcc gga ttc ggt tgt cca ttc aat caa      96
Leu Glu Met Gly Met Val Glu Ala Gly Phe Gly Cys Pro Phe Asn Gln
                -5                      -1  1                      5

gga aga tgt cac aga cat tgt cga agt att cgt cga aga gga gga tat      144
Gly Arg Cys His Arg His Cys Arg Ser Ile Arg Arg Arg Gly Gly Tyr
                10                      15                      20

tgc gat gga ttt ttg aaa caa aga tgt gtt tgt tat cgg aga taa      189
Cys Asp Gly Phe Leu Lys Gln Arg Cys Val Cys Tyr Arg Arg
                25                      30                      35

```

<210> 10

<211> 62

10 <212> PRT

<213> *Mesobuthus gibbosus*

<400> 10

15

```

Met Lys Thr Ile Val Leu Leu Phe Val Leu Ala Leu Val Phe Cys Thr
                -20                      -15                      -10

Leu Glu Met Gly Met Val Glu Ala Gly Phe Gly Cys Pro Phe Asn Gln
                -5                      -1  1                      5

Gly Arg Cys His Arg His Cys Arg Ser Ile Arg Arg Arg Gly Gly Tyr
                10                      15                      20

Cys Asp Gly Phe Leu Lys Gln Arg Cys Val Cys Tyr Arg Arg
                25                      30                      35

```

<210> 11

20 <211> 198

<212> ADN

<213> *Crassostrea gigas*

<220>

25 <221> CDS

<222> (1)..(195)

ES 2 375 150 T3

<220>
 <221> péptido señal
 <222> (1)..(66)

5

<220>
 <221> péptido maduro
 <222> (67)..(195)

10 <400> 11

```

    atg aaa gta ttc gtt ctt tta aca cta gct gtc ctt ctg atg gtt tct      48
    Met Lys Val Phe Val Leu Leu Thr Leu Ala Val Leu Leu Met Val Ser
          -20                    -15                    -10

    gca gac atg gct ttt gct gga ttt ggg tgt ccg ggt aac cag tta aag      96
    Ala Asp Met Ala Phe Ala Gly Phe Gly Cys Pro Gly Asn Gln Leu Lys
          -5                    -1  1                    5                    10

    tgc aac aat cac tgc aag tcc att agt tgt aga gcg ggc tac tgt gat      144
    Cys Asn Asn His Cys Lys Ser Ile Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Cys Asp
                  15                    20                    25

    gca gcc acg ctc tgg tta aga tgt aca tgt acc gat tgt aat gga aag      192
    Ala Ala Thr Leu Trp Leu Arg Cys Thr Cys Thr Asp Cys Asn Gly Lys
                  30                    35                    40

    aag taa      198
    Lys
  
```

15

<210> 12
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> Crassostrea gigas

20

<400> 12

```

    Met Lys Val Phe Val Leu Leu Thr Leu Ala Val Leu Leu Met Val Ser
          -20                    -15                    -10

    Ala Asp Met Ala Phe Ala Gly Phe Gly Cys Pro Gly Asn Gln Leu Lys
          -5                    -1  1                    5                    10

    Cys Asn Asn His Cys Lys Ser Ile Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Cys Asp
                  15                    20                    25

    Ala Ala Thr Leu Trp Leu Arg Cys Thr Cys Thr Asp Cys Asn Gly Lys
                  30                    35                    40

    Lys
  
```

25

ES 2 375 150 T3

```

<210> 13
<211> 195
<212> ADN
<213> Crassostrea virginica
5
<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (192)

10 <220>
<221> péptido señal
<222> (1) .. (66)

<220>
15 <221> péptido maduro
<222> (67)..(192)

<400> 13

20
    atg aaa gtg ttt gtt ctt cta aca ata gct gtc atg ctt ttg gta tct      48
    Met Lys Val Phe Val Leu Leu Thr Ile Ala Val Met Leu Leu Val Ser
        -20                               -15                               -10

    gcc gat gta gct act gca gat aac gga tgt ccc cgt cgt ccg aga atc      96
    Ala Asp Val Ala Thr Ala Asp Asn Gly Cys Pro Arg Arg Pro Arg Ile
        -5                               -1  1                               5                               10

    tgt cac aat cgg tgc ata tac aaa ggt cgt aga ggc gga aaa tgt gtc      144
    Cys His Asn Arg Cys Ile Tyr Lys Gly Arg Arg Gly Gly Lys Cys Val
                15                               20                               25

    gga aag tgg aga agc tta tgc gaa tgc atc tac cca tcg aag gcc ggg      192
    Gly Lys Trp Arg Ser Leu Cys Glu Cys Ile Tyr Pro Ser Lys Ala Gly
                30                               35                               40

    tga                                                                 195

<210> 14
<211> 64
25 <212> PRT
<213> Crassostrea virginica

<400> 14

```

ES 2 375 150 T3

Met Lys Val Phe Val Leu Leu Thr Ile Ala Val Met Leu Leu Val Ser
 -20 -15 -10

Ala Asp Val Ala Thr Ala Asp Asn Gly Cys Pro Arg Arg Pro Arg Ile
 -5 -1 1 5 10

Cys His Asn Arg Cys Ile Tyr Lys Gly Arg Arg Gly Gly Lys Cys Val
 15 20 25

Gly Lys Trp Arg Ser Leu Cys Glu Cys Ile Tyr Pro Ser Lys Ala Gly
 30 35 40

<210> 15
 <211> 207
 <212> ADN
 5 <213> Aspergillus oryzae

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (207)
 10 <220>
 <221> péptido señal
 <222> (1) .. (54)

15 <220>
 <221> péptido maduro
 <222> (79) .. (207)

20 <400> 15

atg aaa ctt ctg acg gtc gcc ttt tcc ctt ctt ctt ctc ggg caa gtc 48
 Met Lys Leu Leu Thr Val Ala Phe Ser Leu Leu Leu Leu Gly Gln Val
 -25 -20 -15

cat gcc agt cct ttg gta ctc gac aaa agg tct tcc tgc cag ttg ggt 96
 His Ala Ser Pro Leu Val Leu Asp Lys Arg Ser Ser Cys Gln Leu Gly
 -10 -5 -1 1 5

gac gtc tgg gac ctc aat gct gca gac gcc gcc tgc agc gct tcg tgt 144
 Asp Val Trp Asp Leu Asn Ala Ala Asp Ala Ala Cys Ser Ala Ser Cys
 10 15 20

gcc att caa cac ggc gac aaa cac ggc gga cac tgc gat aag aac aag 192
 Ala Ile Gln His Gly Asp Lys His Gly Gly His Cys Asp Lys Asn Lys
 25 30 35

gtc tgc gtc tgc aat 207
 Val Cys Val Cys Asn
 40

ES 2 375 150 T3

<210> 16
 <211> 69
 <212> PRT
 <213> Aspergillus oryzae

5

<400> 16

Met Lys Leu Leu Thr Val Ala Phe Ser Leu Leu Leu Leu Gly Gln Val
 -25 -20 -15

His Ala Ser Pro Leu Val Leu Asp Lys Arg Ser Ser Cys Gln Leu Gly
 -10 -5 -1 1 5

Asp Val Trp Asp Leu Asn Ala Ala Asp Ala Ala Cys Ser Ala Ser Cys
 10 15 20

Ala Ile Gln His Gly Asp Lys His Gly Gly His Cys Asp Lys Asn Lys
 25 30 35

Val Cys Val Cys Asn
 40

10 <210> 17
 <211> 362
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Secuencia codificante de pleactasina con intrón (véase ejemplo 1)

<400> 17

20

ggatccacca tgcaatttac caccatcctc tccatcggtg tcaccgtctt cggacttctc 60
 aacaccggag cctttgcagc accccagccg gtacccgagg cttacgctgt ttctgatccc 120
 gaggtcatc ctgacgattt tgctggtatg gatgccaacc aacttcagaa acgtggattt 180
 ggatgcaatg gtccttggga tgaggatgat atgcagtgcc acaagtaaga atcacttata 240
 actagtagat taagccaaga gtattggaac tgatgataaa tagtcaactgc aagtctatta 300
 agggttacaa gggaggttat tgtgctaagg ggggctttgt ttgcaagtgt tactagctcg 360
 ag 362

25 <210> 18
 <211> 303
 <212> ADN

ES 2 375 150 T3

<213> Artificial

<220>

<223> MluN1 carente de intrón con secuencia codificante de pleactasina (ver Ejemplo 3)

5

<400> 18

```

ggatccacca tgcaatttac caccatcctc tccatcggta tcaccgtctt cggactggcc      60
aacaccggag cctttgcagc accccagccg gtacccgagg cttacgctgt ttctgatccc      120
gaggctcatc ctgacgattt tgctgggatg gatgcgaacc aacttcagaa acgtggattt      180
ggatgcaatg gtccttggga tgaggatgat atgcagtgcc acaatcactg caagtctatt      240
aagggttaca agggaggtta ttgtgctaag gggggctttg tttgcaagtg ttactagctc      300
gag                                                                              303
    
```

10

<210> 19

<211> 358

15

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia codificante de plectasina con intrón de pMT2899 (véase ejemplo 3)

20

<400> 19

```

ggatccacca tgcaatttac caccatcctc tccatcggta tcaccgtctt cggactgggt      60
atgtacacca ccccttgcg tctgatctgt gacatatgta gctgactggt cagccaacac      120
cggagccttt gcagcacccc agccgggtacc cgaggcttac gctgtttctg atcccgaggc      180
tcatcctgac gattttgctg gtatggatgc gaaccaactt cagaaacgtg gatttggatg      240
caatggtcct tgggatgagg atgatatgca gtgccacaat cactgcaagt ctattaaggg      300
ttacaaggga ggttattgtg ctaagggggg ctttgtttgc aagtgttact agctcgag      358
    
```

25

<210> 20

<211> 362

30

<212> ADN

<213> Artificial

ES 2 375 150 T3

<220>
<223> Secuencia codificante de plectasina de pMT2900 (véase ejemplo 3)

5 <400> 20

```

ggatccacca tgcaatttac caccatcctc tccatcggta tcaccgtctt cggactgggt      60
aagaatcact tataactagt agattaagcc aagagtattg gaactgatga taaacagcca      120
acaccggagc ctttgcagca ccccagccgg tacccgaggc ttacgctggt tctgatcccg      180
aggctcatcc tgacgatttt gctgggatgg atgcgaacca acttcagaaa cgtggatttg      240
gatgcaatgg tccttgggat gaggatgata tgcagtgcca caatcactgc aagtctatta      300
agggttaciaa gggagggttat tgtgctaagg ggggctttgt ttgcaagtgt tactagctcg      360
ag                                                                              362
    
```

10 <210> 21
<211> 34
<212> ADN
<213> Artificial

15 <220>
<223> cebador A (véase ejemplo 5)

<400> 21

20 tcttggatcc accatgcact tcaccaaggt ctcc 34

25 <210> 22
<211> 33
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> cebador B (véase ejemplo 5)

<400> 22

35 tcttctcgag ttagaaagaa caggtgcagg tac 33

40 <210> 23
<211> 386
<212> ADN

<213> Eurotium amstelodami

<220>

<221> CDS
<222> (10) .. (195)

5 <220>
<221> péptido señal
<222> (10) .. (69)

10 <220>
<221> péptido maduro
<222> (159)..(377)

15 <220>
<221> intrón
<222> (196)..(240)

20 <220>
<221> CDS
<222> (241)..(305)

25 <220>
<221> CDS
<222> (359)..(377)

<400> 23

ES 2 375 150 T3

```

ggatccacc atg cac ttc acc aag gtc tcc acc att ctt ttt acc atc ttc      51
      Met His Phe Thr Lys Val Ser Thr Ile Leu Phe Thr Ile Phe
                -45                      -40                      -35

gcc gcc ggc atc atg gct gct ccc acc gaa gga gtc cgt gag gaa gcc      99
Ala Ala Gly Ile Met Ala Ala Pro Thr Glu Gly Val Arg Glu Glu Ala
                -30                      -25                      -20

gcc cct ggc cag gag gtt tac ccc gac gaa cct cct gct tct ctg acc      147
Ala Pro Gly Gln Glu Val Tyr Pro Asp Glu Pro Pro Ala Ser Leu Thr
                -15                      -10                      -5

aag cgt ggc ttc gga tgt cct ggt gat gcc tac cag tgc agt gaa cac      195
Lys Arg Gly Phe Gly Cys Pro Gly Asp Ala Tyr Gln Cys Ser Glu His
      -1  1                      5                      10

gtatgtcctg ctgctatcta gagtgaatga agctaatagaa tatag tgc agg gcc ctg      252
                                Cys Arg Ala Leu
                                15

ggc ggt gga cgc act gga gga tac tgt gct gga cct tgg tat ttg ggt      300
Gly Gly Gly Arg Thr Gly Gly Tyr Cys Ala Gly Pro Trp Tyr Leu Gly
      20                      25                      30

cac cc  gtatggtgcc tagatattta attgtttata gtcctttact gatgagctta      355
His Pro
35

tag t acc tgc acc tgt tct ttc taactogag      386

```

Thr Cys Thr Cys Ser Phe
40

5 <210> 24
 <211> 90
 <212> PRT
 <213> Eurotium amstelodami

10 <400> 24

ES 2 375 150 T3

Met His Phe Thr Lys Val Ser Thr Ile Leu Phe Thr Ile Phe Ala Ala
-45 -40 -35

Gly Ile Met Ala Ala Pro Thr Glu Gly Val Arg Glu Glu Ala Ala Pro
-30 -25 -20

Gly Gln Glu Val Tyr Pro Asp Glu Pro Pro Ala Ser Leu Thr Lys Arg
-15 -10 -5 -1

Gly Phe Gly Cys Pro Gly Asp Ala Tyr Gln Cys Ser Glu His Cys Arg
1 5 10 15

Ala Leu Gly Gly Gly Arg Thr Gly Gly Tyr Cys Ala Gly Pro Trp Tyr
20 25 30

Leu Gly His Pro Thr Cys Thr Cys Ser Phe
35 40

REIVINDICACIONES

- 5 1. Célula huésped recombinante de *Aspergillus*, comprendiendo un constructo de ácido nucleico, comprendiendo dicho constructo de ácido nucleico una secuencia de ácido nucleico foránea que codifica una defensina de insecto y una o más secuencia(s) de intrón.
- 10 2. Célula huésped de *Aspergillus* según la reivindicación 1, que es una célula huésped de *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*.
- 15 3. Método para la producción recombinante de una defensina de insecto en una célula huésped de *Aspergillus*, que incluye cultivo de la célula huésped de *Aspergillus* comprendiendo un constructo de ácido nucleico, comprendiendo dicho constructo de ácido nucleico una secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido de defensina de insecto y una o más secuencia(s) de intrón, y recuperación del péptido de defensina de insecto.
- 20 4. Método según la reivindicación 3, donde la célula huésped de *Aspergillus* es una célula huésped de *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*.
- 25 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 3-4, que incluye la selección de una célula huésped que exhibe una producción de la defensina en una cantidad de al menos 150% de la cantidad obtenida cuando se usa un constructo de ácido nucleico sin secuencia de intrón.
6. Uso de un constructo de ácido nucleico, comprendiendo una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido de defensina de insecto y una o más secuencia(s) de intrón, para mejorar el nivel de expresión recombinante de la defensina de insecto en una célula huésped de *Aspergillus*.
7. Uso según la reivindicación 6, donde la célula huésped de *Aspergillus* es una célula huésped de *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*.