

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 777**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

A01N 65/00 (2009.01)

C07K 14/375 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2002 E 07101631 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2013 EP 1865059**

54 Título: **Una nueva proteína, un gen que la codifica, y un método para su uso**

30 Prioridad:

12.03.2001 JP 2001068894

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

23.12.2013

73 Titular/es:

**JAPAN TOBACCO, INC. (100.0%)
2-2-1 TORANOMON, MINATO-KU
TOKYO 105-8422, JP**

72 Inventor/es:

TAKAKURA, YOSHIMITSU

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 435 777 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

Una nueva proteína, un gen que la codifica, y un método para su uso

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una nueva proteína que tiene una actividad antifúngica y un método para la producción de la misma, un gen que codifica la proteína, y un método de uso de la proteína y el gen. Específicamente, se refiere a una proteína originada de *Pleurotus cornucopiae* que tiene una actividad antifúngica contra al menos el añublo del arroz (*Magnaporthe grisea*), un gen que codifica la proteína, y un método de uso de la proteína y el gen.

La presente solicitud reivindica la prioridad basada en la Solicitud de Patente Japonesa No. 2001-68894 presentada el 12 de Marzo, 2001.

15 **Técnica anterior**

Enzimas líticas tales como la quitinasa y la β -1,3-glucanasa son conocidas como proteínas vegetales que tiene una actividad antifúngica contra microorganismos patógenos de plantas. Los experimentos in vitro han demostrado que estas enzimas pueden ejercer el efecto si se emplean solas (Schlumbaum et al. (1986), *Nature* 324, págs. 365-367), pero se puede obtener un efecto general mejorado si se utiliza una combinación de dos o más de tales enzimas (Mauch et al. (1988), *Plant Physiol.* 88, págs. 936-942). Se sabe que la concentración de inhibición del crecimiento de estas enzimas líticas contra hongos filamentosos debe ser típicamente de aproximadamente varias decenas a varios cientos de $\mu\text{g/ml}$ cuando se usan solas, o aproximadamente varios $\mu\text{g/ml}$ por enzima cuando se usan combinadas. Sin embargo, se ha informado que ninguna de estas enzimas líticas tiene un efecto antifúngico contra el añublo del arroz (*Magnaporthe grisea*), que causa grandes daños a los cultivos de arroz.

Péptidos antifúngicos (AFP) de bajo peso molecular, tales como la defensina también tienen una actividad antimicrobiana. Entre ellos, se ha informado que Ca-AMP1 (Publicación Doméstica Japonesa Núm. 505048/96), CB-1 (Oita et al. (1996), *Biosci. Biotech. Biochem.* 60, págs. 481-483), Rs-AFP1 y Rs-AFP2 (Terras et al. 1992, *J. Biol. Chem.* 267, págs. 15301-15309) y Ace-AMP1 (Declaración Interna Japonesa Núm. 501424/97) tienen un efecto antifúngico contra el añublo del arroz. Estos péptidos de bajo peso molecular inhiben 50% del crecimiento de diversos microorganismos patógenos de plantas, incluyendo el mencionado anteriormente a una concentración en el orden de varios $\mu\text{g/ml}$.

También se han realizado intentos de crear una planta resistente a enfermedades aislando el gen para una enzima lítica o un péptido antifúngico de bajo peso molecular y transfectándolo a una planta (Broglie et al. (1991), *Science* 254, págs.1194-1197; Terras et al. (1995), *The Plant Cell* 7, págs. 573-588). Un estudio reciente sobre el arroz informó que el arroz transformante obtenido mediante expresión en exceso de quitinasa derivada de arroz ejerció un aumento de la resistencia al añublo del arroz (Nishizawa et al. (1999) *Theor. Appl. Genet.* 99:383-390).

También se ha informado sobre otras plantas resistentes a microorganismos patógenos creadas mediante introducción de genes como para la proteína PR (Alexander et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: págs.7327-7331), glucosa oxidasa (Wu et al. (1995) *Plant Cell* 7: págs.1357-1368), estilbeno sintasa (Hain et al. (1993) *Nature* 361: págs.153-156), etc.

Sin embargo, muchos casos existentes no consiguen obtener plantas transgénicas que tienen resistencia prácticamente aceptable. Esto puede atribuirse al bajo nivel de expresión de los transgenes, y más esencialmente la baja actividad antifúngica de las proteínas antifúngicas notificado hasta la fecha. Por lo tanto, sería deseable identificar y aplicar prácticamente una proteína antifúngica más potente que las convencionales.

50 **Descripción de la invención**

Un objeto de la presente invención es buscar e identificar una nueva proteína antifúngica capaz de inhibir el crecimiento de diversos microorganismos patógenos de plantas, incluyendo añublo del arroz (*Magnaporthe grisea*), que causa grandes daños a los cultivos de arroz.

Otro objeto de la presente invención es clonar un gen que codifica dicha nueva proteína, y determinar la secuencia de nucleótidos del mismo.

Otro objeto más de la presente invención es introducir el gen de la presente invención en un organismo anfitrión (microorganismo, animal, planta, etc.) para crear un transformante, y de este modo aplicar en la práctica el gen de la presente invención.

Otro objeto más de la presente invención es proporcionar un agente antifúngico que contiene la proteína antifúngica de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

5 La FIG. 1 muestra la apariencia de la inhibición del crecimiento de *M. grisea* por la proteína antifúngica de la presente invención (cultivos de 48 horas en la presencia de una fracción de proteína calentada a 80°C durante 10 minutos).

10 La FIG. 2 muestra los patrones electroforéticos de fracciones de proteína de *Pleurotus cornucopiae* separadas por una columna de Q-Sepharose FF con respecto a una actividad antifúngica. M representa un marcador de peso molecular, y FT representa la fracción que ha pasado a través de la columna. Los símbolos (-, +, ++) por debajo de las calles indican la fuerza de la actividad antifúngica. Las actividades antifúngicas mostradas entre paréntesis pertenecen a fracciones distintas de las purificadas descritos en la presente invención.

15 La FIG. 3 muestra un diagrama de separación de la proteína antifúngica de *Pleurotus cornucopiae* mediante columna MonoQ con respecto a una actividad antifúngica. Las posiciones de elución que muestran la actividad antifúngica se indican mediante +.

20 La FIG. 4 muestra patrones electroforéticos de proteína de *Pleurotus cornucopiae* separada mediante una columna Mono Q con respecto a una actividad antifúngica. Los números por encima de las calles corresponden a los números de fracción en la FIG. 3, M representa un marcador de peso molecular, y Ori representa la fracción de Q-Sepharose aplicada en Mono Q. Los símbolos (-, +, ++, +++) por debajo de las calles indican la fuerza de una actividad antifúngica. Las flechas indican la proteína antifúngica (15 kDa).

25 La FIG. 5 muestra un diagrama de separación de la proteína antifúngica de *Pleurotus cornucopiae* mediante Superose 6 con respecto a una actividad antifúngica. Las flechas indican las posiciones de elución del patrón de filtración en Gel (BIO-RAD). Las posiciones de las fracciones que muestran la actividad antifúngica se indican mediante +.

30 La FIG. 6 muestra patrones electroforéticos de proteína de *Pleurotus cornucopiae* purificada mediante Superose 6 con respecto a una actividad antifúngica. Los números por encima de las calles corresponden a los números de fracción en la Fig. 5, Ori representa la fracción MonoQ aplicada en Superose 6 y M representa un marcador de peso molecular. Los símbolos (-, +, ++) por debajo de las calles indican la fuerza de una actividad antifúngica. La flecha indica la proteína antifúngica (15 kDa).

La FIG. 7 muestra un árbol taxonómico molecular de las secuencias de aminoácidos (regiones de proteína maduras) de tamavidina 1 (no de acuerdo con la presente invención) y tamavidina 2, estreptavidina y su homólogo, y avidina.

35 La FIG. 8 muestra los resultados de experimentos de supresión de una actividad antifúngica mediante adición de biotina. Las esporas de *M. grisea* suspendidas en 1/2 PD se colocaron en placas de microtitulación. Los pocillos que contenían 1000 ng/ml de tamavidina 1 purificada (no de acuerdo con la presente invención), estreptavidina y avidina, o pocillos que contenían 100 ng/ml de biotina además de estas proteínas a las mismas concentraciones, o pocillos que no contenían proteína se prepararon y se incubaron a 28°C durante 48 horas. También se muestran los pocillos que contenían 50 ng/ml de tamavidina 1 purificada (no de acuerdo con la invención).

40 La FIG. 9 muestra la purificación de tamavidina 2 recombinante expresada en *E. coli* en una columna de iminobiotina. C representa la fracción de proteína soluble total de *E. coli*, que no se indujo mediante IPTG, y T representa la fracción de proteína soluble total de *E. coli* inducida por IPTG 1 mM. F representa la fracción de proteína que ha pasado a través de la columna de iminobiotina sin unirse a la columna, obtenida a partir de la fracción de proteína soluble total de *E. coli* inducida por IPTG 1 mM, W representa la fracción eluida lavando la columna, y E representa la fracción eluida con un tampón ácido. Las flechas indican la proteína tamavidina 2 (aproximadamente 15 kDa), y M representa un marcador de peso molecular (Kit de marcaje LMW: Pharmacia LKB).

50 Descripción detallada de la invención

Con el propósito de resolver los problemas descritos anteriormente, los autores de la presente invención establecieron en primer lugar un sistema de análisis para evaluar una actividad antifúngica in vitro contra el añublo del arroz.

55 A continuación, las fracciones de proteínas se extrajeron a partir de un hongo comestible *Pleurotus cornucopiae* y se sometieron al análisis antifúngico para identificar las fracciones de proteína antifúngica y aislar y purificar una proteína antifúngica combinando cromatografía de intercambio iónico y filtración en gel. Se determinaron las secuencias de aminoácidos parciales de la proteína purificada, sobre la base de las cuales se sintetizaron las secuencias de oligo ADN, y a continuación, se obtuvo mediante RT-PCR un ADNc parcial que codifica la proteína. Después, se escrutó una biblioteca de ADNc del cuerpo fructífero de *Pleurotus cornucopiae* mediante el uso del ADNc parcial como sonda para identificar un ADNc completo que codifica la proteína, y se determinó la secuencia de nucleótidos total de la misma. Por lo tanto, se identificaron la secuencia de aminoácidos total de la proteína

antifúngica de *Pleurotus cornucopiae* y la secuencia de nucleótidos de un gen que la codifica, completando de este modo la presente invención.

5 Por consiguiente, un primer aspecto de la presente invención proporciona una proteína de acuerdo con la reivindicación 1. La proteína antifúngica de la presente invención incluye una proteína que tiene 141 aminoácidos mostrados en la SEQ ID NO: 4 en la Lista de Secuencias. La proteína que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 4 comprende también una unidad de un polipéptido que tiene un peso molecular de aproximadamente 15 kDa según estimado mediante SDS-PAGE y tiene un peso molecular de aproximadamente 30 kDa determinado mediante una columna de filtración en gel, de manera similar a la proteína que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2.

15 La proteína antifúngica de la presente invención incluye proteínas antifúngicas que tienen no sólo la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 4, sino también una secuencia de aminoácidos que contiene una o más modificaciones de aminoácidos en comparación con la secuencia original o una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de 80% o más con la secuencia original y que muestra una actividad antifúngica contra el añublo del arroz.

20 La proteína antifúngica de la presente invención tiene preferiblemente una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de especialmente 90% o más, más preferiblemente 95% o más con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 4 en la Lista de Secuencias.

La definición de la "proteína que tiene una homología de 80% o más" con cada secuencia de aminoácidos específica referida a la proteína antifúngica de la presente invención, significa que puede tener una homología de al menos el 80% o más, especialmente 90% o más, más preferiblemente 95% o más.

25 Un segundo aspecto de la presente invención proporciona una proteína antifúngica que comprende uno o una combinación de un polipéptido que consiste en una secuencia parcial de aminoácidos del SEQ ID NO: 4 en la Lista de Secuencias, p. ej., un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos parcial 8 - 141 del SEQ ID NO: 4, y un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que contiene uno o más cambios de aminoácidos en cualquiera de dichas secuencias de aminoácidos o un polipéptido que tiene una homología de 80% o más con una cualquiera de dichas secuencias de aminoácidos y que muestra una actividad antifúngica contra el añublo del arroz y que tiene actividad de unión a biotina.

35 Un aspecto adicional de la presente invención proporciona un gen que codifica la proteína antifúngica de la presente invención.

40 El gen de la presente invención tiene típicamente una secuencia de nucleótidos que consiste en una secuencia de nucleótidos de las bases 226-651 del SEQ ID NO: 3 (en lo sucesivo denominado a veces simplemente como "la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 3"), o una secuencia nucleótido que contiene una sustitución, delección, inserción y/o adición de una o más bases de dicha secuencia de nucleótidos, o una secuencia de nucleótidos que hibrida con dicha secuencia de nucleótidos en condiciones rigurosas.

45 El gen de la presente invención tiene generalmente una secuencia de nucleótidos que tiene preferiblemente una homología de 80% o más, especialmente 90% o más, más preferiblemente 95% o más con la secuencia de nucleótidos de las bases 226-651 del SEQ ID NO: 3.

Un aspecto adicional de la presente invención proporciona un oligonucleótido para la obtención de la proteína de unión a biotina de *Pleurotus cornucopiae*.

50 El oligonucleótido de la presente invención tiene preferiblemente la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los SEQ ID NO: 16 a 19 en la Lista de Secuencias.

55 Un aspecto adicional de la presente invención proporciona un método para aislar el gen de la presente invención, que comprende realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico usando dos tipos de oligonucleótidos descritos anteriormente como par de cebadores y una biblioteca de ADNc del cuerpo fructífero de *Pleurotus cornucopiae* como molde para amplificar una porción del gen que codifica la proteína antifúngica de la presente invención, y escrutar dicha biblioteca de ADNc mediante el uso de producto de amplificación obtenido de este modo como sonda para aislar el clon de ADNc completo.

60 Otro aspecto adicional de la presente invención proporciona un vector recombinante que comprende el gen de la presente invención.

Como para el vector recombinante de la presente invención, el vector es preferiblemente un vector de expresión. Un aspecto adicional de la presente invención proporciona un transformante obtenido introduciendo el vector recombinante de la presente invención en un organismo anfitrión.

Realizaciones preferidas de la invención

Las realizaciones preferidas se describen en detalle a continuación para explicar la presente invención.

5

Proteína antifúngica derivada de *Pleurotus cornucopiae*

10

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una proteína derivada de *Pleurotus cornucopiae* que tiene un efecto antifúngico contra microorganismos patógenos de plantas. La proteína de la presente invención no está limitada a cualquier origen o proceso de preparación específico con tal que tenga las características definidas en la presente memoria es decir, la proteína antifúngica de la presente invención puede ser de origen natural o expresada a partir de ADN recombinante mediante técnicas de ingeniería genética o sintetizada químicamente.

15

La proteína de la presente invención tiene típicamente la secuencia de 141 aminoácidos mostrada en el SEQ ID NO: 4 en la Lista de Secuencias. Sin embargo, es bien sabido que las proteínas naturales incluyen proteínas variantes que tienen una o más modificaciones de aminoácidos resultantes de diferencias en variedades de los organismos que producen la proteína, o la mutación génica dependiendo de las diferencias de ecotipos o la presencia de isozimas estrechamente similares. Según se utiliza en la presente memoria, el término "modificación de aminoácidos" significa sustitución, delección, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos. La presente invención incluye la proteína que tiene las secuencias de aminoácidos mostradas en el SEQ ID NO: 4 supuestas a partir de las secuencias de nucleótidos de los genes clonados, pero no se limita a las mismos. Es decir, se pretende que abarque todas las proteínas homólogas que tienen las características definidas en la presente memoria. La homología es de 80% o más, especialmente 90% o más, más preferiblemente 95% o más.

20

Generalmente, una proteína modificada que contiene un sustituto de uno por otro aminoácido que tiene propiedades similares (tal como un sustituto de un aminoácido hidrófobo por otro aminoácido hidrófobo, un sustituto de un aminoácido hidrófilo por otro aminoácido hidrófilo, un sustituto de un aminoácido ácido por otro aminoácido ácido o un sustituto de un aminoácido alcalino por otro aminoácido alcalino) a menudo tiene propiedades similares a las de la proteína original. Los métodos para preparar una proteína recombinante de este tipo que tiene una modificación deseada usando técnicas de ingeniería genética son bien conocidos por los expertos en la técnica y dichas proteínas modificadas también se incluyen en el alcance de la presente invención. Por ejemplo, se puede utilizar la mutagénesis de sitio dirigido se describe en *Molecular Cloning*, segunda edición (Sambrook et al., (1989)).

25

30

Según se utiliza en la presente memoria, el porcentaje de homología se puede determinar por comparación con la información de secuencia usando el programa BLAST descrito por Altschul et al. (*Nucl. Ácidos. Res.* 25, págs. 3389-3402, 1997), por ejemplo. Este programa está disponible en la página web del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) o Banco de Datos de ADN de Japón (DDBJ) en Internet. Diversas condiciones (parámetros) para búsquedas de homología con el programa BLAST se describen en detalle en el sitio, y las búsquedas se realizan normalmente con valores por defecto, aunque algunos ajustes se pueden cambiar algo. Alternativamente, se puede determinar por comparación con la información de la secuencia utilizando un programa de soporte lógico de análisis de la secuencia genética tal como GENETYX (Software Development Co., Ltd.) o DNASIS (Hitachi Software Engineering).

35

40

Las búsquedas de homología se realizaron a través de bases de datos GenBank usando BLAST para la proteína antifúngica derivada de *Pleurotus cornucopiae*, y su gen así como sus homólogos y proteínas que tienen una secuencia de aminoácidos codificada por el mismo. Las búsquedas de bases de datos para la secuencia de aminoácidos de una proteína antifúngica derivada de *Pleurotus cornucopiae* (secuencia de aminoácidos total del SEQ ID NO: 2) revelaron emparejamientos con estreptavidina v2 de *Streptomyces violaceus* (Número de acceso: Q53533, Bayer et al. (1995) *Biochim Biophys Acta* 1263: págs. 60-66), Estreptavidina v1 (Número de acceso: Q53532), estreptavidina de *Streptomyces avidina ii* (Núm. de acceso: P22629, Argarana et al. (1986) *Nucleic Acids Res* 14: págs. 1871-1882), etc. La homología de estas tres secuencias se extiende a lo largo de 128 aminoácidos, y era de 50%, 49% y 49%, respectivamente. También se mostró a lo largo de 120 aminoácidos una homología de 51,7% con una estreptavidina central mutante w79f (Cadena B) (Freitag et al. (1997) *Protein Sci.* 6: págs. 1157-1166).

45

50

También se emparejaron avidina de clara de huevo (Gope et al. (1987) *Nucleic Acids Res* 15: págs. 3595-3606) y varias proteínas relacionadas con avidina (Keinanen et al. (1994) *Eur J Biochem* 220: págs. 615-621) con menores grados de homología. Estos hechos indican que la presente proteína es una nueva proteína.

55

60

Las búsquedas de base de datos de la secuencia de aminoácidos de la proteína antifúngica derivada de *Pleurotus cornucopiae* de la presente invención (secuencia de aminoácidos total del SEQ ID NO: 4) mostraron homología de 50%, 48% y 48% con estreptavidina v2, v1 y estreptavidina, respectivamente.

La presente proteína antifúngica fue denominada "tamavidina" ya que era una nueva proteína de tipo estreptavidina purificada a partir de un hongo comestible *Pleurotus cornucopiae* (Tamogitake). Aquí, el gen derivado de la proteína purificada se denomina tam1, la proteína que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por el mismo se denomina tamavidina 1, un homólogo de tam1 se denomina tam 2, y la proteína que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por el mismo se denomina tamavidina 2.

Se cree que los residuos de aminoácidos 1-7 de los SEQ ID NO: 2 y 4 corresponden al péptido líder de un precursor de la proteína antifúngica. Por lo tanto, los residuos de aminoácidos 8-143 del SEQ ID NO: 2 y 8-141 del SEQ ID NO: 4 son formas maduras de la proteína antifúngica. En consecuencia, la presente invención también proporciona una proteína antifúngica que comprende uno cualquiera o una combinación de un polipéptido que consiste en una secuencia parcial de aminoácidos del SEQ ID NO: 4, que comprende los aminoácidos 8-141; y un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que contiene una o más modificaciones de aminoácidos en cualquiera de dichas secuencias de aminoácidos o un polipéptido que tiene una homología superior al 80% con una cualquiera de dichas secuencias de aminoácidos y que muestra una actividad antifúngica contra el añublo del arroz y una actividad de unión a biotina.

La purificación y el aislamiento de una proteína como se describe en la presente memoria se puede lograr combinando apropiadamente métodos convencionales para la purificación y el aislamiento de proteínas, tales como precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico (Mono Q, Q Sepharose o DEAE), filtración en gel (Superose 6, Superose 12).

Por ejemplo, se extrae con un tampón polvo molido de *Pleurotus cornucopiae*, y a continuación se filtra, y el sobrenadante se deja en reposo con sulfato de amonio a una concentración adecuada, p. ej., 75% de saturación para proporcionar precipitados, como se describe en los ejemplos de más abajo. Los precipitados se dializan y a continuación se hacen eluir mediante cromatografía de intercambio iónico usando un gradiente de concentración de sal (por ejemplo, NaCl 50 mM - 600 mM), y después las fracciones que contienen una proteína deseada se recuperan sobre la base de una actividad antifúngica. Las fracciones que tienen un peso molecular de alrededor de 30 kDa se pueden recuperar mediante filtración en gel. La proteína antifúngica de la presente invención tiene un peso molecular de, pero no se limita a, aproximadamente 15 kDa, según se determina mediante SDS-PAGE.

Alternativamente, dicha proteína se puede obtener en una cantidad masiva introduciendo una secuencia de ADN que consta de 226 (o 247) a 651 de la secuencia de ADN del SEQ ID NO: 3 en *E. coli*, levaduras o insectos o algunas células animales mediante técnicas de introducción conocidas utilizando un vector de expresión susceptible de amplificación en cada anfitrión y expresándola.

La secuencia de aminoácidos de esta proteína y la secuencia de ADN que la codifica descrita en la presente memoria se pueden utilizar total o parcialmente para aislar fácilmente un gen que codifica una proteína que tiene una actividad fisiológica similar a partir de otras especies, preferiblemente hongos, más preferiblemente Eumycota incluyendo setas, mohos y levaduras y Basidiomycotina incluyendo muchas setas, más preferiblemente setas Agaricales a los que pertenece *Pleurotus cornucopiae*, por ejemplo, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edodes*, *Armillariella mellea*, *Tricholoma matsutake*, setas shimeji, *Flammulina velutipes*, *Grifola frondosa*, *Cantharellus cibarius*, *Pleurotus eryngii* utilizando técnicas básicas de ingeniería genética, incluyendo hibridación y PCR. En tales casos, estas nuevas proteínas también están incluidas en el alcance de la presente invención.

45 Gen para la proteína antifúngica

La presente invención también proporciona un gen que codifica la proteína antifúngica de la presente invención. El tipo de gen de la presente invención no está limitado específicamente, pero puede ser cualquiera de ADN nativo, ADN recombinante o ADN sintetizado químicamente, y cualquier clon de ADN genómico o clon de ADNc.

El gen de la presente invención tiene típicamente la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3. Sin embargo, la secuencia de nucleótidos de un clon obtenido en los ejemplos mostrados a continuación es sólo un ejemplo. Es bien conocido por los expertos en la técnica que los genes naturales incluyen variaciones resultantes de diferencias en variedades de los organismos que producen el gen, o de mutación de menor importancia dependiendo de las diferencias en ecotipos o de mutación de menor importancia dependiendo de la presencia de isozimas estrechamente similares. Por consiguiente, el gen de la presente invención no se limita sólo al que tiene la secuencia de nucleótidos del SEQ ID NO: 3 en la Lista de Secuencias, y se pretende que abarque todos los genes que codifican la proteína antifúngica de la presente invención.

Especialmente, se pueden utilizar total o parcialmente la secuencia de aminoácidos de las proteínas y la secuencia de ADN que las codifica descrita en la presente memoria para aislar fácilmente a partir de otras especies un gen que codifica una proteína que tiene una actividad fisiológica similar usando técnicas de ingeniería genética, incluyendo hibridación y reacciones amplificación de ácido nucleico. En tales casos, estos genes también están incluidos en el alcance de la presente invención.

Las búsquedas BLAST a través de bases de datos GenBank utilizando la secuencia de ADN de un gen que codifica la proteína antifúngica derivada de *Pleurotus cornucopiae* (secuencia de ADN de 71 a 502 del SEQ ID NO: 1) y la secuencia de ADN de un gen que codifica la segunda proteína antifúngica derivada de *Pleurotus cornucopiae* (secuencia de ADN 226-651 del SEQ ID NO: 3) encontraron solamente varias secuencias que muestran homología en un intervalo muy corto (23 pb) pero no la secuencia de ADN de estreptavidina. Esto significa que la secuencia de ADN que codifica la nueva proteína de la presente invención no es altamente homóloga a la secuencia de ADN de estreptavidina a nivel de ADN.

Más específicamente, se utilizó un programa de soporte lógico de análisis de secuencia genética GENETYX-WIN versión 3.2 (Software Development Co., Ltd.) para analizar la homología de las secuencias de aminoácidos totales de las proteínas antifúngicas de *Pleurotus cornucopiae* de la presente invención (tamavidinas 1 y 2) con la estreptavidina (que difiere de las estreptavidinas v2 y v1 en sólo 9 aminoácidos y 1 aminoácido, respectivamente). Como resultado, la secuencia de aminoácidos de la tamavidina 1 codificada por tam1 descrita en la presente memoria mostró una homología (identidad de aminoácidos) del 46,7% y la secuencia de aminoácidos de la tamavidina 2 codificada por tam2 mostró 48,1%. La homología de la secuencia de ADN total (SEC ID NO: 1 y 3 en la Lista de Secuencias) con la estreptavidina fue de 53,8% para tam1 y de 51,0% para tam2. La homología de la proteína antifúngica de *Pleurotus cornucopiae* codificada por tam1 con la avidina de clara de huevo fue de 31,2% en la secuencia de aminoácidos y de 42,4% en la secuencia de ADN, y la homología de la proteína antifúngica de *Pleurotus cornucopiae* codificada por tam 2 con la avidina de clara de huevo fue de 36,2% en secuencia de aminoácidos y de 41,8% en la secuencia de ADN. La homología entre las secuencias de aminoácidos de la tamavidina 1 y la tamavidina 2 y la homología entre las secuencias de ADN de los genes tam1 y tam 2 que las codifican fueron de 65,5% y 64,5%, respectivamente.

En comparación con la estreptavidina, la tamavidina 1 (no de acuerdo con la invención) y la tamavidina 2 de la presente invención están truncados por los 33 aminoácidos N terminales, pero todos los residuos de triptófano (W) (Gitlin et al. (1988) *Biochem. J* 256: págs. 279-282) y los residuos de tirosina (Y) (Gitlin et al. (1990) *Biochem. J* 269: págs. 527-530) posiblemente implicados en la unión a biotina se conservan, (Y 34 y 45 y W 82, 98 y 110 en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2, y 34 y 45 y W 80, 96 y 108 en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 4).

Los pesos moleculares medios de las regiones que se presume que son regiones de proteínas maduras (tramos 8-143 de la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2, y 8-141 de la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 4) se calcularon a 15158,4 y 14732,2, respectivamente, cerca de los pesos moleculares medios de la estreptavidina madura y la avidina madura (16490,6 y 14342,9, respectivamente).

La estreptavidina deriva de *Actinomyces Streptomyces avidinii* y la avidina deriva de clara de huevo de aves (*Gallus gallus*). Proteínas muy similares a la estreptavidina aisladas hasta ahora incluyen las estreptavidinas v1 y v2 de *Streptomyces violaceus* (Bayer et al. (1995) *Biochim Biophys Acta* 1263: págs. 60-66), y los homólogos del gen de la avidina aislados hasta la fecha incluyen un gen relacionado con avidina aviar (AVR1-avr5, Keinänen et al. (1994) *Eur J Biochem* 220: págs. 615-621). Las estreptavidinas v1 y v2 difieren de estreptavidina en la secuencia de aminoácidos en 1 aminoácido y 9 aminoácidos, respectivamente, y la proteína relacionada con avidina tiene una homología con avidina de 68-78% en la secuencia de aminoácidos y de 88-92% en la secuencia de ADN. La homología entre estreptavidina y avidina es 29,2% en la secuencia de aminoácidos, y de 46,8% en la secuencia de ADN.

Un ejemplo preferido de la proteína antifúngica de la presente invención, tamavidina 2 deriva de una especie de los Basidiomicetos, *Pleurotus cornucopiae*, y tiene una homología de 48,1% con la estreptavidina en la secuencia de aminoácidos y una homología del 36,2% con la avidina en la secuencia de aminoácidos, como se describió anteriormente. Las tamavidinas 1, 2 forman un tercer grupo distinto del grupo de estreptavidina de *Actinomyces* y el grupo de avidina aviar. Dicha proteína de tipo avidina se aisló en primer lugar de fuentes distintas de actinomicetos y aviares. Las tamavidinas 1, 2 son proteínas de tipo avidina presentes en setas, y es probable que otras variedades de setas contengan proteínas similares. Las secuencias de aminoácidos de tamavidinas 1, 2 y las secuencias de ADN de tam1, tam2 pueden usarse para buscar y aislar adicionalmente dichas proteínas y sus genes.

Las condiciones de hibridación utilizadas para escrutar genes homólogos no están específicamente limitadas, pero se prefieren generalmente las condiciones rigurosas, tales como varias horas a toda la noche en 5 x SSC, 5 x solución de Denhardt, SDS al 1% a 25-68°C como se describe en *Current Protocols in Molecular Biology* Vol. 1 (John Wiley and Sons, Inc.) o *Molecular Cloning* 2ª edición (Sambrook et al. (1989)). La temperatura de hibridación aquí es más preferiblemente 45-68°C (sin formamida) o 30-42°C (formamida al 50%). Las condiciones de lavado implican por ejemplo, 0,2 x SSC a 45-68°C. Es bien conocido por los expertos en la técnica que un ADN que contiene una secuencia de nucleótidos que tiene una homología más alta que un nivel predeterminado puede clonarse seleccionando apropiadamente condiciones de hibridación tales como el nivel de formamida, el nivel de sal y la temperatura.

Las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos incluyen aquí reacciones que implican ciclos de temperatura tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki y col., 1985, Science, 230, págs. 1350-1354), reacción en cadena de la ligasa (LCR) (Wu y col., 1989, Genomics, 4, págs. 560-569; Barringer et al., 1990, Gene, 89, págs. 117-122; Barany et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 189-193) y amplificación basada en la transcripción (Kwoh et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, págs. 1173-1177) así como reacciones isotérmicas tales como amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) (Walker et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, págs. 392-396; Walker et al., 1992, Nuc. Acids Res., 20, págs. 1691-1696), replicación de secuencia autosostenida (3SR) (Guatelli et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, págs. 1874-1878), y el sistema de replicasa Q β (Lizardi et al., 1988, Biotechnology, 6, págs. 1197-1202). También se pueden utilizar otras reacciones tales como la amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA) usando amplificación competitiva de un ácido nucleico diana y una secuencia mutante descrita en la Patente Europea Núm. 0525882. Se prefiere una PCR.

Los genes homólogos de acuerdo con la invención clonados mediante hibridación o reacciones de amplificación de ácidos nucleicos como antes tienen una homología de 80% o más, especialmente 90% o más, más preferiblemente 95% o más con la secuencia de nucleótidos mostrada en el SEQ ID NO: 3 en la Lista de Secuencias.

Oligonucleótidos

También se describe en la presente memoria un oligonucleótido para obtener una proteína antifúngica obtenida de *Pleurotus cornucopiae*, que es producida por un método que comprende:

seleccionar dos regiones de una secuencia de bases de un gen que codifica la proteína antifúngica del SEQ ID NO: 1 en base a los siguientes requisitos;

- 1) la longitud de cada región es de 15-30 bases;
- 2) la proporción del contenido de G+ C en una secuencia de bases de cada región es de 40-60%;

preparar un ADN de cadena sencilla que tiene una secuencia de bases que es idéntica a dicha región o complementaria a dicha región, o preparar la mezcla de ADN de cadena sencilla en base a la degeneración del código genético sin cambiar una secuencia de residuos de aminoácidos codificados por dichos ADN de cadena sencilla; y

preparar opcionalmente una versión modificada de dichos ADN de cadena sencilla, no alterando dicha modificación una especificidad de unión de los ADN de cadena sencilla a la secuencia de bases del gen que codifica dicha proteína antifúngica. El oligonucleótido de la presente invención se puede utilizar para, p. ej. reacciones de hibridación o amplificación tales como PCR usando dos de los oligonucleótidos adecuados como par de cebadores para detectar o aislar el gen de la presente invención.

El oligonucleótido de la presente invención tiene preferiblemente una secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de los SEQ ID NO: 16-19 en la Lista de Secuencias. Las secuencias de nucleótidos de los SEQ ID NO: 10-13 se diseñaron sobre la base de la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 9 como cebadores de PCR para la clonación de un fragmento de gen que codifica una parte de la proteína y comprende todas las bases capaces de codificar el aminoácido. Los nucleótidos de los SEQ ID NO: 14-17 son cebadores sintetizados para el paseo del cebador para descodificar las secuencias de nucleótidos totales de los genes tam1 y tam2. Los nucleótidos de los SEQ ID NO: 18-19 son cebadores de PCR preparados sobre la base del SEQ ID NO: 3 para amplificar el ORF total de para construir un vector de expresión para expresar la proteína recombinante tamavidina 2 que tiene la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 4.

Un fragmento parcial del gen de la presente invención se puede aislar mediante reacciones de amplificación de ácidos nucleicos tales como PCR usando una biblioteca de ADNc del cuerpo fructífero de *Pleurotus cornucopiae* como molde con un par apropiado de los oligonucleótidos anteriores. Se puede aislar un clon de ADNc completo mediante el escrutinio de la genoteca de ADNc con un producto de amplificación obtenido de este modo como sonda, p. ej. mediante hibridación en placa. Los procedimientos y las condiciones para las reacciones de amplificación de ácidos nucleicos y las condiciones de hibridación en placa son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Por ejemplo, pueden usarse condiciones de hibridación de rigurosidad bastante baja, tales como, pero no limitadas a, temperatura ambiente y lavado a altas concentraciones de sal tales como 2 x SSC a 37°C como se describe en Current Protocols in Molecular Biology Vol. 1 (John Wiley and Sons, Inc.) o Molecular Cloning (Sambrook et al., Supra.).

Preparación de proteínas antifúngicas recombinantes

La proteína de la presente invención tiene una actividad antifúngica muy fuerte. Por ejemplo, inhibe completamente la germinación de esporas de añublo del arroz (*M. grisea*) a una concentración tan baja como 50 ng/ml (véase el

Ejemplo 4 a continuación). No aparece germinación de esporas a esta concentración incluso después de una incubación prolongada, lo que sugiere que el efecto de la proteína de la presente invención contra el añublo del arroz puede ser un efecto destructor del hongo en lugar de la inhibición parcial del crecimiento. Para el conocimiento de los autores de la presente invención, no se ha informado hasta ahora sobre proteínas antifúngicas que puedan inhibir completamente el crecimiento de microorganismos patógenos a una concentración tan baja (del orden de nanogramos). En los ejemplos siguientes, se utilizó un patógeno principal del arroz, añublo del arroz, como patógeno de plantas para el análisis antifúngico para purificar una proteína antifúngica, pero es muy posible que las proteínas antifúngicas de *Pleurotus cornucopiae* identificadas en la presente memoria tengan efectos antifúngicos comparables contra otros daños de patógenos de plantas tales como *Rhizoctonia solani*.

Por lo tanto, la proteína antifúngica derivada de *Pleurotus cornucopiae* de la presente invención tiene una potente actividad antifúngica, de modo que se puede utilizar en formulaciones tales como agentes antifúngicos y plaguicidas, que pueden contener la proteína antifúngica en una forma activa. En este caso, la presente proteína se purifica a partir de *Pleurotus cornucopiae* mediante el uso de p. ej., una columna de intercambio iónico o una columna de filtración en gel como se describe en los ejemplos siguientes. Sin embargo, la proteína antifúngica de *Pleurotus cornucopiae* de la presente invención se puede preparar más convenientemente en cantidades masivas introduciendo y expresando ADN que tiene la secuencia de nucleótidos de 226-651 del SEQ ID NO: 3 que codifica la proteína en *E. coli*, levaduras, insectos o células animales usando un vector de expresión susceptible de amplificación en cada anfitrión (Ejemplo 5).

La presente invención también proporciona un vector recombinante que contiene el gen de la presente invención. Los métodos para la inserción de un fragmento de ADN del gen de la presente invención en un vector tal como un plásmido son descritos, por ejemplo, por Sambrook, J. et al. en *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2ª edición), Cold Spring Harbor Laboratory, 1.53 (1989). Se pueden utilizar convenientemente los kits de ligación disponibles en el mercado (por ejemplo, disponible de Takara Shuzo Co., Ltd). Los vectores recombinantes obtenidos de este modo (por ejemplo, plásmidos recombinantes) se introducen en las células anfitrionas (p. ej., *E. coli* TB1, LE392 o XL-1Blue).

Los métodos adecuados para la introducción de un plásmido en una célula anfitriona incluyen el uso de fosfato de calcio o cloruro de calcio/cloruro de rubidio, electroporación, electroinyección, tratamiento químico con PEG o similares, el uso de una pistola génica descrito por Sambrook J. et al., en *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2ª edición), Cold Spring Harbor Laboratory, 1.74 (1989).

Los vectores pueden prepararse convenientemente conectando un gen deseado mediante un método convencional a un vector de recombinación disponible en la técnica (por ejemplo, ADN plasmídico). Los ejemplos específicos de los vectores adecuados incluyen, pero no se limitan a, plásmidos derivados de *E. coli* tales como pBluescript, pUC18, pUC19, pBR322, pTrc99A.

Los vectores de expresión son especialmente útiles para el propósito de producir una proteína deseada. Los tipos de vectores de expresión no están limitados específicamente con tal que puedan expresar un gen deseado en diversas células anfitrionas procarionóticas y/o eucarióticas para producir una proteína deseada, pero preferiblemente incluyen vectores de expresión para *E. coli* tales como pQE-30, pQE-60, pMAL-C2, pMAL-p2, pSE420; vectores de expresión para levaduras tales como pYES2 (género *Saccharomyces*), pPIC3.5K, pPIC9K, pAO815 (todo el género *Pichia*), y vectores de expresión para insectos tales como pBacPAK8/9, pBK283, pVL1392, pBlueBac4.5.

Los transformantes se pueden preparar mediante la introducción de un vector de expresión deseado en una célula anfitriona. Las células anfitrionas adecuadas no están limitadas específicamente con tal que sean compatibles con vectores de expresión y transformables, e incluyen diversas células tales como células naturales o células recombinantes establecidas artificialmente utilizadas comúnmente en el campo de la presente invención. Los ejemplos son las bacterias (*Escherichia*, *Bacillus*), levaduras (*Saccharomyces*, *Pichia*), células animales, células de insecto, células vegetales, etc.

Las células anfitrionas son preferiblemente *E. coli*, levaduras o células de insecto, específicamente *E. coli* tal como M15, JM109, BL21; levaduras tales como INVSc1 (género *Saccharomyces*), GS115, KM71 (todo el género *Pichia*); células de insectos tales como BmN4, larvas de gusanos de seda. Los ejemplos de las células animales son las derivadas de ratón, *Xenopus*, rata, hámster, simio o líneas celulares humanas o de cultivo establecidas a partir de estas células. Las células vegetales incluyen las derivadas de tabaco, *Arabidopsis*, arroz, maíz, trigo, etc., pero no están limitadas específicamente con tal que puedan ser cultivadas.

Cuando se utiliza una bacteria, especialmente *E. coli* como célula anfitriona, el vector de expresión consiste generalmente en al menos una región promotora/operadora, un codón de iniciación, un gen que codifica una proteína antifúngica deseada, un codón de terminación, un terminador y una unidad replicable.

Cuando se utiliza una levadura, célula vegetal, célula animal o célula de insecto como célula anfitriona, el vector de expresión generalmente contiene preferiblemente al menos un promotor, un codón de iniciación, un gen que codifica una proteína antifúngica deseada, un codón de terminación y un terminador. También puede contener un ADN que codifica un péptido señal, una secuencia potenciadora, regiones 5' y 3' no traducidas del gen deseado, un marcador seleccionable o una unidad replicable, etc., si se desea.

Un codón de iniciación preferido en vectores de la presente invención es un codón de metionina (ATG). Los codones de terminación pueden ser codones de terminación convencionales (por ejemplo, TAG, TGA, TAA).

La unidad replicable significa un ADN capaz de replicar la secuencia de ADN en una célula anfitriona, e incluye plásmidos naturales, plásmidos modificados artificialmente (plásmidos preparados a partir de plásmidos naturales) y plásmidos sintéticos, etc. Los plásmidos preferidos son pQE30, PET o pCAL o sus modificaciones artificiales (fragmentos de ADN obtenidos tratando pQE30, PET o pCAL con endonucleasas de restricción adecuadas) para *E. coli*; pYES2 o pPIC9K para levaduras, y pBacPAK8/9 para células de insecto.

Las secuencias potenciadoras y secuencias terminadoras pueden ser las utilizadas comúnmente por los expertos en la técnica, tales como las derivadas de SV40.

En cuanto a los marcadores seleccionables, los usados comúnmente pueden ser utilizados por medio de métodos convencionales. Los ejemplos son los genes, que proporcionan resistencia a antibióticos tales como tetraciclina, ampicilina, kanamicina, neomicina, higromicina o espectinomina.

Los vectores de expresión se pueden preparar conectando consecutivamente y cíclicamente al menos el promotor descrito anteriormente, el codón de iniciación, el gen que codifica una proteína antifúngica deseada, el codón de terminación y la región terminadora y a una unidad replicable adecuada. En este procedimiento, se puede utilizar un fragmento de ADN adecuado (tal como un conector u otro sitio de enzima de restricción) por medio de métodos convencionales, tales como la digestión con una enzima de restricción o ligación con ADN ligasa de T4, si se desea.

La introducción [transformación (transducción)] de vectores de expresión de la presente invención en células anfitrionas puede llevarse a cabo mediante el uso de técnicas conocidas.

Por ejemplo, se pueden transformar bacterias (tales como *E. coli*, *Bacillus subtilis*) mediante el método de Cohen et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)], el método del protoplasto [Mol. Gen. Genet., 168, 111 (1979)] o el método competente [J. Mol. Biol., 56, 209 (1971)]; *Saccharomyces cerevisiae* puede transformarse mediante el método de Hinnen et al [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1927 (1978)] o el método con litio [J. Bacteriol., 153, 163 (1983)]; las células vegetales se pueden transformar mediante el método del disco de hoja [Science, 227, 129 (1985)] o electroporación [Nature, 319, 791 (1986)]; las células animales se pueden transformar mediante el método de Graham [Virology, 52, 456 (1973)]; las células de insecto se pueden transformar mediante el método de Summers, et al. [Mol. Cell. Biol., 3, 2156-2165 (1983)].

Vectores de transformación de plantas son especialmente útiles para el propósito de crear una planta resistente a enfermedades usando un fragmento de ADN de la presente invención. Los tipos de vectores para plantas no están limitados específicamente siempre que puedan expresar el gen de interés en células vegetales para producir la proteína, pero preferiblemente incluyen pBI221, pBI121 (Clontech), y vectores derivados de allí. Especialmente, los ejemplos de los vectores para transformar monocotiledóneas incluyen pIG121Hm y pTOK233 (Hiei et al., Plant J., 6,271-282 (1994)), y pSB424 (Komari et al., Plant J., 10, 165-174 (1996)).

Las plantas transgénicas se pueden preparar reemplazando el gen de la β -glucuronidasa (GUS) en los vectores anteriores por un fragmento de ADN de la presente invención para construir un vector de transformación de plantas e introduciéndolo en una planta. El vector de transformación de plantas contiene preferiblemente al menos un promotor, un codón de iniciación, un gen deseado (una secuencia de ADN de la presente invención o una parte de la misma), un codón de terminación y un terminador. También puede contener un ADN que codifica un péptido señal, una secuencia potenciadora, regiones 5' y 3' no traducidas del gen deseado, una región marcadora seleccionable, etc., si se desea.

Los promotores y terminadores no se limitan específicamente con tal que sean funcionales en las células vegetales, entre los cuales los promotores de expresión constitutivos incluyen el promotor 35S que se inserta inicialmente en los vectores anteriores así como promotores para genes de actina y ubiquitina. Sin embargo, se puede insertar más preferiblemente un promotor inducible. Esto permite que las plantas transgénicas sean resistentes a una plaga produciendo la proteína solamente cuando entran en contacto con él. Los promotores inducibles adecuados incluyen promotores de genes de fenilalanina amoniaco-liasa, quitinasa, glucanasa, tionina, y osmosina y otros promotores de genes que responden a plagas o estreses.

Los métodos para la transducción génica a una planta incluyen el uso de *Agrobacterium* (Horsch et al., *Science*, 227 129 (1985); Hiei et al., *Plant J.*, 6, págs. 271-282 (1994)), electroporación (Fromm et al., *Nature*, 319, 791 (1986)), PEG (Paszowski et al., *EMBO J.*, 3, 2717 (1984)), microinyección (Crossway et al., *Mol. Gen. Genet.*, 202, 179 (1986)), bombardeo de partículas (McCabe et al., *Bio/Technology*, 6, 923 (1988)), pero no se limitan específicamente con tal que sean adecuados para la transfección de un gen a una planta deseada. Las especies de plantas anfitrionas no están limitadas específicamente, tampoco, en tanto sean compatibles con los vectores de transformación de plantas de la presente invención y transformables, específicamente plantas comúnmente utilizadas en el campo de la presente invención, por ejemplo dicotiledóneas tales como tabaco, *Arabidopsis*, tomate, pepino, zanahoria, soja, patata, remolacha, nabo, repollo chino, colza, algodón y petunia; y monocotiledóneas tales como arroz, maíz y trigo.

La proteína de la presente invención se puede expresar (producir) cultivando células transformadas que contienen un vector de expresión preparado como se ha descrito anteriormente en un medio nutriente. El medio nutriente contiene preferiblemente una fuente de carbono, nitrógeno inorgánico o de nitrógeno orgánico necesaria para el crecimiento de las células anfitrionas (transformantes). Los ejemplos de las fuentes de carbono incluyen p. ej., glucosa, dextrano, almidón soluble, sacarosa y metanol. Los ejemplos de las fuentes de nitrógeno inorgánico u orgánico incluyen sales de amonio, nitratos, aminoácidos, aguas de infusión de maíz, peptona, caseína, extracto de carne, harina de soja y extracto de patata. Si se desea, pueden estar contenidos otros nutrientes (por ejemplo, sales inorgánicas tales como cloruro de sodio, cloruro de calcio, dihidrogenofosfato de sodio y cloruro de magnesio; vitaminas; antibióticos tales como la tetraciclina, neomicina, ampicilina y kanamicina).

La incubación se lleva a cabo mediante mecanismos conocidos en la técnica. Las condiciones de incubación tales como la temperatura, el pH del medio y el período de incubación se seleccionan apropiadamente para producir la proteína de la presente invención en cantidades masivas. Para la expresión en *E. coli*, las condiciones de incubación para expresar una proteína recombinante incluyen, pero no se limitan a, la incubación a una temperatura de 4-40°C y la inducción con IPTG 0,01-5,0 mM.

La proteína de la presente invención se puede obtener a partir de los cultivos de la siguiente manera. Cuando la proteína de la presente invención se acumula en las células anfitrionas, las células anfitrionas se recogen mediante centrifugación o filtración o similares y se suspenden en un tampón adecuado (p. ej., un tampón tal como tampón Tris aproximadamente 10 M - 100 mM, tampón de fosfato, tampón HEPES o tampón MES a un pH en función del tampón utilizado, pero deseablemente en el intervalo de pH de 5,0 a 9,0), a continuación, las células se rompen mediante un método adecuado para las células anfitrionas utilizadas y se centrifugan para recoger el contenido de las células anfitrionas. Cuando la proteína de la presente invención se secreta fuera de las células anfitrionas, las células anfitrionas y el medio de cultivo se separan mediante centrifugación o filtración o similares para proporcionar un producto filtrado de cultivo. Los lisados de células anfitrionas o los productos filtrados de cultivo se pueden utilizar para aislar/purificar la proteína de la presente invención directamente o después de precipitación con sulfato de amonio y diálisis.

Un método de aislamiento/purificación es el siguiente. Cuando la proteína de interés se etiqueta con 6 x histidina, GST, proteína de unión a maltosa o similares, se pueden utilizar métodos convencionales basados en cromatografía de afinidad adecuados para cada etiqueta. Como ejemplo no limitante, se expresó una proteína antifúngica recombinante marcada con 6 x histidina en el extremo N-terminal en el Ejemplo 4 de más abajo. Esta proteína recombinante se purificó utilizando agarosa Ni-NTA (Qiagen) que tiene afinidad por 6 x histidina. Cuando la proteína de la presente invención se produce sin el uso de estas etiquetas, se puede utilizar el método descrito en detalle en los ejemplos de más abajo basado en cromatografía de intercambio iónico, por ejemplo. Estos métodos pueden combinarse con filtración en gel o cromatografía hidrófoba, cromatografía isoeléctrica o similares. También puede aplicarse la purificación en una columna de afinidad de iminobiotina como describen Hofmann et al., (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: págs. 4666-4668 (1980)). En el Ejemplo 5 de más abajo, la proteína recombinante, tamavidina 2 se obtuvo con un rendimiento de 1 mg a partir de 50 ml de cultivos de *E. coli*.

Las proteínas antifúngicas de la presente invención obtenidas mediante técnicas de ingeniería genética o purificadas a partir de fuentes naturales como se ha descrito anteriormente tienen actividad antifúngica. La actividad antifúngica se puede determinar mediante, pero no está limitada a, incubación de placas de microtitulación que contienen esporas de añublo del arroz suspendidas en un medio de cultivo (por ejemplo, 1/2 PD, sacarosa-peptona) en presencia de la proteína antifúngica de la presente invención a una concentración predeterminada, p. ej. 10 ng/ml-1000 ng/ml, preferiblemente 50 ng/ml a 28°C durante 48 horas, y evaluando si el crecimiento/proliferación del añublo del arroz (por ejemplo extensión de las hifas) se inhibe o no en comparación con un control que no contiene la proteína antifúngica (Ejemplo 4).

Alternativamente, también se puede aplicar el siguiente análisis. Una colonia del añublo del arroz se coloca en el centro de un medio de agar preparado en una placa de Petri y se añade gota a gota una cantidad predeterminada de una solución acuosa de la proteína antifúngica de la presente invención alrededor de la colonia, y la placa de Petri se incuba a 28°C durante aproximadamente 48 horas a una semana. A continuación, se puede analizar la actividad

antifúngica mediante la evaluación de si la extensión de las hifas del añublo del arroz en regiones tratadas con la proteína antifúngica se inhibe o no en comparación con regiones no tratadas.

Agentes antifúngicos

5 Las proteínas de la presente invención tienen una potente actividad antifúngica. Por ejemplo, inhiben el crecimiento de las hifas del añublo del arroz a una baja concentración tal como 50 ng/ml en el análisis antifúngico de los autores de la presente invención. En los ejemplos de más abajo se utilizaron *M. grisea* y *Rhizoctonia solani*, que causan grandes daños a los cultivos de arroz, como patógenos de plantas para el ensayo antifúngico. La proteína antifúngica de *Pleurotus cornucopiae* identificada en la presente memoria mostró un efecto antifúngico contra los mismos. Es más probable que la proteína de la presente invención tenga un efecto antifúngico contra microorganismos patógenos de plantas distintas de *M. grisea*.

10 Por lo tanto, la proteína antifúngica derivada de *Pleurotus cornucopiae* de la presente invención tiene una potente actividad antifúngica, de modo que se puede utilizar en formulaciones tales como agentes antifúngicos y plaguicidas, que pueden contener la proteína antifúngica en una forma activa. En este caso, la proteína de la presente invención se puede preparar en una cantidad masiva mediante la inserción de una secuencia de ADN que codifica la proteína de la presente invención en un vector de expresión funcional en p. ej. *E. coli* o levaduras como se ha descrito anteriormente.

15 La proteína antifúngica de la presente invención es una nueva proteína de tipo estreptavidina, lo que sugiere que se une a una de las vitaminas, biotina (vitamina H). Se sabe que el añublo del arroz requiere biotina para su crecimiento. Estos hechos sugieren que la presente proteína antifúngica se une a la biotina libre presente en el medio de análisis para inducir deficiencia de biotina en los medios, con el resultado de que se inhibía el crecimiento del añublo del arroz. De hecho, la actividad antifúngica de la tamavidina 1 de la presente invención fue anulada cuando la biotina se añadía en exceso al medio de ensayo como se describe en el Ejemplo 4 de más abajo. Los autores de la presente invención encontraron adicionalmente que la estreptavidina y la avidina disponibles en el mercado también tienen un efecto antifúngico contra el añublo del arroz similar a tamavidina 1, y demostraron que este efecto también es suprimido por la biotina.

20 La presente invención sugirió la posibilidad de que la resistencia a la enfermedad, especialmente al añublo del arroz pueda ser conferida a las plantas mediante el control de la cantidad de una de las vitaminas, biotina. La posibilidad de que la resistencia a las enfermedades pueda ser conferida mediante el control de una vitamina no era conocida hasta ahora. Este es un concepto nuevo. Este concepto también está incluido en la presente invención. Por ejemplo, se puede utilizar como pesticida formulación que contiene la proteína antifúngica de la presente invención como un ingrediente activo. En este caso, las proteínas de unión a biotina distintas de la proteína antifúngica de la presente invención (p. ej. estreptavidina de *Streptomyces avidinii* y avidina de clara de huevo, y homólogos de las mismas) también se incluyen en el mismo concepto.

25 Por lo tanto, la presente invención describe un agente antifúngico que contiene la proteína antifúngica descrita en la presente memoria como ingrediente activo. Normalmente, el agente antifúngico puede aplicarse sistémica o localmente a plantas.

30 La dosis de dispersión del agente antifúngico depende del tipo de planta, la fase del crecimiento, la afección, el método de dispersión, el tiempo de tratamiento, el tipo de la proteína aplicada (por ejemplo, una proteína completa o una proteína obtenida por sustitución, delección, inserción y/o adición de una parte de la primera proteína), el clima y el suelo del sitio en el que crece la planta, y otros factores, y el agente antifúngico puede dispersarse una vez o más al día o a intervalos de varios días. El agente antifúngico de la presente invención también puede dispersarse mezclado con solubilizantes, agentes de suspensión, emulsionantes, etc., si fuera necesario. Los solubilizantes acuosos o no acuosos y agentes de suspensión se mezclan como al menos un diluyente inerte con una o más sustancias activas. Los ejemplos de los diluyentes acuosos incluyen agua destilada y solución salina. Los ejemplos de los diluyentes no acuosos incluyen propilenglicol, polietilenglicol, y aceites vegetales tales como aceite de oliva y alcoholes tales como etanol.

35 Tales composiciones antifúngicas pueden contener adicionalmente agentes auxiliares tales como conservantes, humectantes, emulsionantes, dispersantes o estabilizantes (por ejemplo arginina, ácido aspártico, etc.)

40 Estas composiciones se esterilizan mediante filtración a través de un filtro bacteriostático o la adición de un bactericida o irradiación, si fuera necesario. También se pueden preparar en forma de composiciones sólidas estériles, por ejemplo, mediante secado por congelación y después disolver en agua destilada u otros disolventes antes de su uso.

La forma de dosificación del agente antifúngico obtenido de este modo puede determinarse apropiadamente dependiendo del propósito, es decir, se puede aplicar en forma de comprimidos, píldoras, polvos, gránulos, soluciones, emulsiones, etc., mezclado con los aditivos mencionados anteriormente.

5 También se pueden crear plantas resistentes a las enfermedades mediante la inserción de un gen que codifica la proteína antifúngica de la presente invención en una planta. Por lo tanto, se puede crear una planta resistente a las enfermedades p. ej., introduciendo una planta con un constructo en el que un promotor funcional en la planta está unido a un gen que codifica la proteína antifúngica de la presente invención y se añade adicionalmente un terminador funcional en la planta aguas abajo. En este caso, puede añadirse una secuencia de ADN que codifica un péptido señal para la secreción extracelular funcional en la planta al lado 5' del gen que codifica la proteína antifúngica de la presente invención con el fin de promover la secreción de tamavidina fuera de las células vegetales. Alternativamente, el uso de codones del gen puede adaptarse a monocotiledóneas o dicotiledóneas sin afectar a los aminoácidos para promover la acumulación de la proteína antifúngica dentro o fuera de las células vegetales. Los métodos para crear plantas resistentes a enfermedades usando combinaciones de estos medios también se incluyen en la presente invención.

Las aplicaciones de tamavidina, avidina, estreptavidina o proteínas estrechamente similares a las mismas para crear plantas resistentes a enfermedades y para plantas distintas de arroz también se incluyen en la presente invención. Aunque el hongo patógeno analizado en la presente memoria es el añublo del arroz, es bastante posible que también estén cubiertos otros hongos patógenos de plantas y bacterias patógenas que requieren biotina para su crecimiento.

Por otra parte, se pueden producir naturalmente efectos similares no sólo contra microorganismos patógenos de plantas sino también hongos patógenos de animales que requieren esencialmente biotina para su crecimiento, especialmente microorganismos patógenos para los seres humanos y animales domésticos, y por lo tanto, la presente invención abarca los usos de la proteína antifúngica de la presente invención, avidina o estreptavidina, y proteínas estrechamente similares a las mismas como agentes terapéuticos en tales escenarios.

La secuencia de ADN de estreptavidina ya se ha descrito (Garwin et al., WO/8602077), Pero las secuencias de ADN de tam1 (no de acuerdo con la presente invención) y tam2 de la presente invención no se emparejaron con el ADN de la estreptavidina durante búsquedas de bases de datos ordinarias y en realidad mostraron homología con el ADN de la estreptavidina solamente a 51,0-53,8% durante la comparación forzada usando un programa de soporte lógico de análisis de secuencia de ácido nucleico/aminoácidos, como se ha descrito anteriormente.

La estreptavidina y la avidina ya se han utilizado ampliamente como reactivos experimentales en diversos escenarios en biología molecular, bioquímica o similares porque tienen muy fuerte afinidad de unión a biotina y derivados de la misma. Por ejemplo, se utilizan en sistemas de detección de ácidos nucleicos y proteínas (Liang. Documento WO/9707244) o métodos de purificación basados en la afinidad de unión a la biotina de la estreptavidina o la avidina expresadas como una proteína de fusión (Skerra et al. EP835934, Kopetzki. WO/9711186). La tamavidina 1 (no de acuerdo con la presente invención) y la tamavidina 2 de la presente invención también pueden usarse en estas aplicaciones ampliamente conocidas o referidas en la actualidad.

Las aplicaciones relacionadas con las plantas de estreptavidina o avidina referidas hasta ahora incluyen la creación de plantas masculinas estériles utilizando avidina (Howard y Albertsen. Documento WO/9640949), la aplicación de estreptavidina o avidina como proteína insecticida (Czapla et al. Documento WO/9400992), y la producción de avidina en plantas (Baszczynski et al. Patente de los Estados Unidos Núm. 5767379). Los usos de estreptavidina o avidina descritos en estos documentos también se puede aplicar a la proteína antifúngica derivada de *Pleurotus cornucopiae* de la presente invención.

50 Referencias

[0102]

1. Schlumbaum et al. (1986) *Nature* 324: págs. 365-367
2. Mauch et al. (1988) *Plant Physiol.* 88: págs. 936-942
3. Publicación Doméstica Japonesa Núm. 505048/96
4. Oita et al. (1996) *Biosci. Biotech. Biochem.* 60: págs. 481-483
5. Terras et al. (1992) *J. Biol. Chem.* 267: págs. 15301-15309
6. Publicación Doméstica Japonesa Núm. 501424/97
7. Broglie et al. (1991) *Science* 254: págs. 1194-1197
8. Terras et al. (1995) *The Plant Cell* 7: págs. 573-588
9. Nishizawa et al. (1999) *Theor Appl Genet* 99:383-390
10. Alexander et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: págs. 7327-7331
11. Wu et al. (1995) *Plant Cell* 7: págs. 1357-1368
12. Hain et al. (1993) *Nature* 361: págs. 153-156

13. Bayer et al. (1995) *Biochim Biophys Acta* 1263: págs. 60-66
 14. Argarana et al. (1986) *Nucleic Acids Res* 14: págs. 1871-1882
 15. Freitag et al. (1997) *Protein Sci.* 6: págs. 1157-1166
 16. Gope et al. (1987) *Nucleic Acids Res* 15: págs. 3595-3606
 5 17. Keinanen et al. (1994) *Eur J Biochem* 220: págs. 615-621
 18. Gitlin et al. (1988) *Biochem.J* 256: págs. 279-282
 19. Gitlin et al. (1990) *Biochem J* 269: págs. 527-530
 20. Hofmann et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: págs. 4666-4668 (1980)
 21. Garwin et al. Documento WO/8602077
 10 22. Liang. Documento WO/9707244
 23. Skerra et al. Documento EP 835934
 24. Kopetzki. Documento WO/9711186
 25. Howard and Albertsen. Documento WO/9640949
 26. Czaplá et al. WO/9400992
 15 27. Baszczynski et al. Patente de los Estados Unidos Núm. 5767379.

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la presente invención sin, sin embargo, limitar la invención a los mismos.

20 Ejemplos

Ejemplo 1: Construcción de un sistema de análisis

25 1) Establecimiento de un sistema de análisis

El cultivo de hongos patógenos: *Magnaporthe grisea* (añublo del arroz) (estirpe 337, cepa TUS-1 obtenido de Centro Nacional de Investigación Agrícola de la región de Tohoku del Ministerio de Agricultura, Silvicultura y Pesca de Japón) se cultivó en un medio de harina de avena (Difco, con un suplemento de sacarosa al 1%) para proporcionar conidios para su uso como inóculo. Las esporas se almacenaron a -80°C en glicerol al 10%, si fuera necesario.

30 Se cultivó *Rhizoctonia solani* (cepa JT872) en medio de caldo patata-dextrosa (PD, Difco) durante 2 días, y se trituraron suavemente tres micelios de aproximadamente 5 mm en 1/2 PD en un homogeneizador de Teflón para proporcionar fragmentos de hifas para su uso como inóculo.

35 Estos inóculos se añadieron a placas de microtitulación de 96 pocillos (Corning) a una densidad de aproximadamente 1.000 conidios de *M. grisea* por pocillo o aproximadamente 300 fragmentos de hifas de *R. solani* por pocillo en 100 µl de 1/2 PD y se incubaron en una incubadora a 28°C durante 48 horas. El crecimiento de los hongos se verificó midiendo la absorbancia a 595 nm con un lector de microplacas (Benchmark, Bio-Rad).

40 2) Extracción de la proteína de *Pleurotus cornucopiae*

Después de cortar finamente con tijeras de antemano 100 g de cuerpos fructíferos asequibles comercialmente de *Pleurotus cornucopiae*, se congelaron en nitrógeno líquido y se molieron en un mortero en polvo fino, y después se extrajeron con 300 ml de tampón HEPES-KOH 100 mM, pH 7,5 a 4°C durante 30 minutos con agitación suave. El extracto se filtró a través de Miracloth y después se centrifugó a 10.000 xg durante 20 minutos. A continuación, el sobrenadante se dejó reposar a 4°C durante la noche con sulfato de amonio de 75% de saturación. A continuación, los precipitados se obtuvieron por centrifugación a 15.000 xg durante 20 minutos y se disolvieron en 3 ml de tampón HEPES-KOH 10 mM, pH 7,5 y se dializaron frente a tampón HEPES-KOH 20 mM, pH 7,5 usando un tubo de diálisis (Spectra/Por1 MWCO 6-8000, Spectrum Medical Industries). La materia insoluble se eliminó por centrifugación para proporcionar una muestra de proteína de *Pleurotus cornucopiae*. El nivel de proteína de la muestra de proteína de *Pleurotus cornucopiae* se determinó mediante el método de Bradford usando albúmina de suero bovino (BSA) como proteína patrón.

55 Ejemplo 2: Purificación de la proteína antifúngica

1) Actividad antifúngica de la muestra de proteína de *Pleurotus cornucopiae* bruta

Los sistemas de cultivo de *M. grisea* y *R. solani* se añadieron con una cantidad dada de la muestra de proteína de *P. cornucopiae* bruta añadida inmediatamente después del cultivo de partida, se incubaron durante 2 días (46-48 horas), y a continuación se evaluaron para determinar la actividad antifúngica midiendo la absorbancia. Los resultados mostraron que el extracto de *Pleurotus cornucopiae* contenía una sustancia que tenía una alta actividad antifúngica tanto contra *Magnaporthe grisea* como contra *Rhizoctonia solani*. Se observó una inhibición completa de la germinación y la inhibición del crecimiento de las hifas contra *M. grisea* y se observó una inhibición del crecimiento de hifas contra *R. solani*. En cuanto a las células de *M. grisea*, el citoplasma se separó de la pared celular y tenía el aspecto de una plasmólisis.

Para analizar adicionalmente la naturaleza de la actividad antifúngica detectada, se sometió a ensayo la actividad residual después de calentar. El análisis antifúngico se realizó después de calentar a 60 y 80°C durante 10 minutos. La fuerza de la actividad se estimó diluyendo la muestra de proteína. Como resultado, la actividad antifúngica tanto

5 contra *M. grisea* y *R. solani* era comparable antes y después de calentar a 60°C. Sin embargo, la actividad antifúngica contra *R. solani* desapareció después de calentar a 80°C. En contraste, se demostró una nueva actividad contra *M. grisea* por la hinchazón de los ápices de las hifas detuvo el crecimiento después del calentamiento a 80°C, aunque se perdió la actividad de inducción de plasmolisis (FIG. 1).

10 Para conocer el peso molecular aproximado de la sustancia central que regula estas actividades contenidas en fracciones calentadas de la muestra de proteína bruta de *Pleurotus cornucopiae*, la muestra se fraccionó a través de una membrana de ultrafiltración para estudiar una actividad antifúngica separando la muestra en fracciones que pasaban o no a través de una unidad de filtro Ultrafree MC10.000 NMWL (corte de peso molecular 10.000, Millipore)

15 utilizada como membrana de ultrafiltración. Como resultado, todas las actividades existían solamente en fracciones retenidas en la membrana. Por lo tanto, se estimó que el peso molecular del núcleo activo era al menos 10000 o superior.

2) Purificación mediante cromatografía de intercambio iónico

20 A continuación, se purificó la proteína antifúngica. Inicialmente, se cargaron 150 mg/20 ml de la muestra de proteína bruta en una columna de fabricación casera (diámetro interno 1,5 cm x altura 10 cm, volumen de columna 10 ml) cargada con un intercambiador de iones Q Sepharose FF (Pharmacia) para purificar parcialmente la proteína antifúngica. Se utilizó un tampón Tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 50 mM a Tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 600 mM como tampón

25 de elución con un gradiente (50 mM a 600 mM de NaCl) a una velocidad de flujo de 2 ml/min durante 100 minutos. Una parte de cada fracción (12,5 ml) se sometió al ensayo antifúngico contra *M. grisea* y electroforesis en SDS-PAGE. La solución de proteína de cada fracción se hizo reaccionar con una cantidad equivalente de 2 x SDS

30 tampón de migración (Sambrook y col. (1989) Molecular Cloning 2ª edición, Cold Spring Harbor) a 95°C durante 5 minutos y, a continuación, se hizo migrar mediante electroforesis en SDS-PAGE de acuerdo con el método de Laemmli (Laemmli (1970) Nature 227: págs. 680-685). El gel utilizado es PAGEL al 15% (ATTO) y la proteína se

35 detectó con un kit Silver Stain II Wako (Wako Pure Chemical Industries). Para estimar el peso molecular aproximado y la cantidad de la proteína, se utilizó un marcador de peso molecular (kit de marcaje LMW: Pharmacia LKB, tamaños 94 kDa, 67 kDa, 43 kDa, 30 kDa, 20,1 kDa, 14,4 kDa). Los patrones electroforéticos de la proteína

40 mediante tinción de plata se muestran en la FIG. 2 con respecto a la fuerza de una actividad antifúngica. Dos picos aparecieron como actividades antifúngicas a concentraciones de NaCl de 160 mM y 240 mM-280 mM. La proteína contenida en el pico a 160 mM actuaba hinchando los ápices de las hifas para detener el crecimiento, y no

35 desaparecía después de calentar a 70°C durante 10 minutos. Sin embargo, la proteína contenida en el pico a 240 mM-280 mM indujo plasmólisis en *M. grisea* y desapareció después de calentar a la misma temperatura. Por lo tanto, se hizo un intento de purificar la proteína antifúngica contenida en el pico a 160 mM.

40 Las fracciones correspondientes a la concentración de NaCl de 120 mM-240 mM se transfirieron a un tubo de diálisis (Spectra/Por1 MWCO 6-8000, Spectrum Medical Industries), y se dializaron contra Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 50 mM a 4°C durante la noche. La concentración en Centriprep-10 (peso molecular de corte 10.000, Amicon) estuvo

45 seguida de calentamiento a 70°C durante 30 minutos. Después de la centrifugación, el sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0,22 µm. Esta muestra de proteína (aproximadamente 10 ml) se cargó en MonoQ HR 5/5 (Pharmacia) para separar/purificar la proteína antifúngica. Se utilizó un tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 50 mM

50 a Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 500 mM como tampón de elución con un gradiente (50 mM a 500 mM de NaCl) a una velocidad de flujo de 1 ml/min durante 40 minutos comenzando a los 20 minutos después de cargar la muestra. Una parte de cada fracción (1 ml) se sometió al ensayo antifúngico contra *M. grisea* y a electroforesis en SDS-

PAGE.

El diagrama de HPLC se muestra en la FIG. 3 en relación con la fuerza de una actividad antifúngica. Los resultados muestran que aparecía un pico de elución de la proteína antifúngica alrededor de una fuerza iónica (concentración de NaCl) de 200 mM-260 mM.

55 El patrón electroforético se muestra en la FIG. 4 en relación con la fuerza de una actividad antifúngica. La figura en la parte superior de cada calle se corresponde con el número de fracción en la FIG. 3. El examen cuidadoso de las

bandas de proteína posiblemente relacionadas con una actividad antifúngica encontró dos bandas de aproximadamente 15 kD como probables candidatas (flechas en la FIG. 4). La fuerza de las bandas y el nivel de

60 actividad antifúngica se correlacionan positivamente, lo que sugiere la posibilidad de que las bandas puedan ser la proteína antifúngica central.

3) Purificación mediante filtración en gel y estimación del peso molecular

Para purificar la proteína antifúngica de *Pleurotus cornucopiae* y estimar el peso molecular nativo, las fracciones Mono Q Núm. 41-46 obtenidas como antes se concentraron en una unidad de filtro Ultrafree MC10.000 NMWL (Millipore) y se cargaron en una columna de filtración en gel Superose 6 HR 10/30 (Pharmacia). El tampón utilizado es MES-NaOH 50 mM, pH 6,0, NaCl 50 mM a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min. Los pesos moleculares y los tiempos de elución aproximados de la proteína se predijeron mediante patrones de filtración en gel (BIO-RAD), y a continuación se cargaron las fracciones MonoQ que tenían una actividad antifúngica.

Como resultado, apareció un pico agudo a 30 kDa cuando la proteína se controló a A280 (FIG. 5). La actividad antifúngica se concentró al máximo y cerca de 30 kDa. Esto muestra que la actividad antifúngica de *Pleurotus cornucopiae* deriva de una única proteína que tiene un peso molecular de aproximadamente 30 kDa como se determina por filtración en gel. Cuando cada fracción (0,25 ml) se tiñó con plata después de SDS-PAGE, se detectó una banda de 15 kDa que se muestra en la FIG. 4 solo en torno a 30 kDa (FIG. 6). No apareció ninguna otra banda de 15 kDa, sugiriendo fuertemente de nuevo que la proteína de 15 kDa contribuye a una actividad antifúngica. La cantidad de la proteína antifúngica se estimó a partir de un marcador de peso molecular (inhibidor de tripsina a 20,1 kDa) mediante un densitómetro y la concentración de inhibición del 50% de crecimiento contra *M. grisea* se calculó en aproximadamente 50 ng/ml. La cantidad de la proteína antifúngica que se puede purificar a partir de un peso en bruto de 100 g de cuerpos fructíferos de *Pleurotus cornucopiae* mediante el método anterior fue de aproximadamente 0,2 mg.

Ejemplo 3: Aislamiento del ADNc

1) Determinación de la secuencia de aminoácidos de la proteína antifúngica de *Pleurotus cornucopiae*

La fracción de Superose 6 obtenida como antes se concentró en un Ultrafree MC 10.000 NMWL (Millipore) y se sometió a electroforesis en SDS-PAGE. La fracción se transfirió a una membrana de PVDF (Millipore) en un sistema tampón que no contenía ni Tris ni glicina, y se tiñó ligeramente con Azul Brillante de Coomassie R-250 y luego se decoloró. A continuación, se escindió la banda de proteína de 15 kDa que contribuía posiblemente a una actividad antifúngica. La proteína de 15 kDa se digirió parcialmente con lisil endopeptidasa (Wako Pure Chemical Industries) o proteasa V8 (Wako Pure Chemical Industries).

Como resultado, se obtuvo una fracción de 14 kDa mediante digestión con lisil endopeptidasa y se obtuvieron fracciones de 14 kDa y 12 kDa mediante digestión con proteasa V8. Estas bandas también fueron trasladadas después de la migración. A continuación, la secuencia de aminoácidos N-terminal se determinó mediante degradación de Edman utilizando un secuenciador de proteínas en fase gaseosa (HPG1005A Protein Sequencing System).

Como resultado, se determinaron los siguientes 44 aminoácidos a partir de la proteína de 15 kDa:

N'-Leu Xaa Gly Xaa Trp Tyr Asn Glu Leu Gly Xaa Xaa Met Asn Leu Thr Ala Asn Lys Asp Gly Ser Leu Xaa Gly Thr Tyr His Ser Asn Val Gly Glu Val Pro Xaa Xaa Tyr His Leu Ala Gly Arg Tyr-C' (SEQ ID NO: 5) (no de acuerdo con la invención)

en donde y en lo sucesivo, Xaa se desconoce. Los siguientes 50 aminoácidos se determinaron a partir del producto digerido con lisil endopeptidasa de la proteína de 14 kDa:

N'-Asp Gly Ser Leu Thr Tyr His Ser Asn Val Gly Glu Val Pro Pro Thr Tyr His Leu Ser Gly Arg Tyr Asn Leu Gln Pro Pro Ser Gly Gln Gly Val Thr Leu Gly Xaa Ala Val Ser Phe Glu Asn Thr Xaa Ala Asn Val-C' (SEQ ID NO: 6) (no de acuerdo con la invención).

Los siguientes 21 aminoácidos se determinaron a partir del producto digerido de la proteasa V8 de la proteína de 14 kDa:

N'-Leu Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Glu Leu Gly Ser Thr Met Asn Leu Thr Ala Asn Lys Asp Gly-C' (SEQ ID NO: 7) (no de acuerdo con la invención).

Los siguientes 23 aminoácidos se determinaron a partir de la proteína de 12 kDa:

N'-Leu Thr Gly Thr Xaa Tyr Asn Glu Leu Gly Ser Thr Xaa Asn Leu Thr Ala Asn Xaa Asp Gly Xaa Leu-C' (SEQ ID NO: 8) (no de acuerdo con la invención).

Finalmente, se determinaron los siguientes 69 aminoácidos:

N'-Leu Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Glu Leu Gly Ser Thr Met Asn Leu Thr Ala Asn Lys Asp Gly Ser Leu Thr Gly Thr Tyr His Ser Asn Val Gly Glu Val Pro Pro Thr Tyr His Leu Ser Gly Arg Tyr Asn Leu Gln Pro Pro Ser Gly Gln Gly Val Thr Leu Gly Xaa Ala Val Ser Phe Glu Asn Thr Xaa Ala Asn Val-C' (SEQ ID NO: 9) (no de acuerdo con la invención).

2) Diseño de cebadores degenerados

Basándose en la secuencia de aminoácidos determinada en 1), se sintetizaron cuatro cebadores que contenían todas las bases posibles. Las cifras entre paréntesis muestran el grado de degeneración.

TMR1: 5'-acngnactgtgayaayg-3 '(256)

5 (correspondiente a los residuos de aminoácidos Thr2 a Glu8 del SEQ ID NO: 9) (SEQ ID NO: 10) (no de acuerdo con la invención)

TMR2: 5'-garytggwswsnacnatgaa-3 '(256)

10 (correspondiente a los residuos de aminoácidos Glu8 a Asn14 del SEQ ID NO: 9) (SEQ ID NO: 11) (no de acuerdo con la invención)

TMF1: 5'-gtrttycraaiswiacn-3 '(128)

15 (correspondiente a los residuos de aminoácidos Ala59 a Thr65 del SEQ ID NO: 9) (SEQ ID NO: 12) (no de acuerdo con la invención)

TMF2: 5'-cciarignacnccytgncc-3 '(256)

20 (correspondiente a los residuos de aminoácidos Gly51 a Gly57 del SEQ ID NO: 9) (SEQ ID NO: 13) no de acuerdo con la invención)

en donde "i" significa "inosina", "r" significa "g o a", "y" significa "c o t", "w" significa "a o t", "s" significa "g o c", y "n" significa "a o g o c o t", respectivamente.

3) Construcción de una biblioteca de ADNc de cuerpo fructífero de *Pleurotus cornucopiae*

25 El ácido nucleico total se extrajo del cuerpo fructífero de *Pleurotus cornucopiae* mediante el método de SDS- fenol y el ARN total se recuperó mediante precipitación con cloruro de litio. A continuación, se preparó ARNm de *Pleurotus cornucopiae* a partir del ARN total usando un kit de purificación de ARNm (Pharmacia). De aproximadamente 5 g de cuerpos fructíferos, se obtuvieron 10 µg de ARNm, de los cuales 5 µg se utilizaron en un kit de síntesis de ADNc ZAP (Stratagene) para sintetizar ADNc. Aproximadamente 0,5-5 kb de ADNc se fraccionaron mediante filtración en gel y se ligaron a un vector Uni-ZAP XR (Stratagene) y se empaquetaron con Gigapack III (Stratagene). Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con las instrucciones del kit. El título de la biblioteca de ADNc del cuerpo fructífero de *Pleurotus cornucopiae* obtenido de este modo se estimó en aproximadamente 3.000.000 ufp.

4) Preparación de sondas mediante RT-PCR

35 Se realizó una PCR usando los cebadores sintetizados en 2) y el ADNc sintetizado en 3) como molde para intentar amplificar un ADNc parcial de la proteína antifúngica de *Pleurotus cornucopiae* adecuado como sonda para el escrutinio de bibliotecas. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: se hicieron circular 50 µl de una solución de reacción que contenía 10 ng de ADNc, 5 µl de tampón Taq 10xEx, 4 µl de cada dNTP 2,5 mM, 5 pmoles/secuencia de cada cebador y 1 µl de Ex Taq (Takara) + anticuerpo Taq START (Clontech) en 1 ciclo a 94°C durante 3 min, 35 ciclos de 94°C durante 1 min, 50°C durante 1 min, y 72°C durante 1 min, y a continuación 1 ciclo a 72°C durante 6 min utilizando un sistema de control de temperatura programado PC-700 (ASTEK). Como resultado, se amplificó un producto de aproximadamente 150-190 pb con cada uno de los pares de cebadores TMR1-TMRF1, TMR1-TMRF2, TMR2-TMRF1 y TMR2-TMRF2.

45 Estos productos de PCR se purificaron en gel y se clonaron en un vector pCRII (Invitrogen). Estos clones se secuenciaron para revelar que contenían dos ADNc, es decir, un ADNc que codifica estrictamente la misma secuencia de aminoácidos determinada en 1) (derivado de los pares TMR2-TMRF1 y TMR2-TMRF2; especialmente, el ADNc derivado del par TMR2-TMRF2 se denomina TM100), y un ADNc que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de aproximadamente 75% con la secuencia de aminoácidos determinada en 1) (derivado de los pares TMR1-TMRF1, TMR1-TMRF2; especialmente, el ADNc derivado del par TMR1-TMRF1 se denomina TM75).

5) Escrutinio del ADNc completo

55 Los clones de ADNc TM100 y TM75 obtenidos en 4) se escindieron del vector y se utilizaron como sondas para escrutar la biblioteca de ADNc del cuerpo fructífero de *Pleurotus cornucopiae*. En una placa de Petri cuadrada (14 x 10 cm), se sembraron aproximadamente 20.000 pfu de fago con un anfitrón XL1-Blue MRF' de acuerdo con las instrucciones proporcionadas para un kit de síntesis de ADNc ZAP (Stratagene). La placa se puso en contacto con Hybond-N + filtro de membrana de nylon (Amersham) para desnaturalizar el ADN mediante álcali como se indicó para la membrana, y se inmovilizó sobre la membrana. Las sondas se marcaron con ³²P utilizando un Sistema de marcaje de ADN Rediprime II[™] (Amersham). La hibridación se realizó en NaHPO₄ 0,5 M (pH 7,2), SDS al 7%, EDTA 1 mM a 65°C durante la noche, seguido de lavado dos veces en NaHPO₄ 40 mM (pH 7,2), SDS al 1%, EDTA 1 mM a 65°C durante 20 minutos. El escrutinio primario de aproximadamente 160.000 pfu del fago proporcionó 600 clones positivos con la sonda TM100 y 30 clones positivos con la sonda TM75. Entre ellos, 24 clones de la sonda TM100 y

12 clones de la sonda TM75 se sometieron adicionalmente a escrutinio secundario y también se apuntó a un tercer escrutinio para la purificación de la placa, y todos los clones seleccionados se escindieron in vivo según las instrucciones para el kit de síntesis de ADNc ZAP (Stratagene). Como resultado, 18 clones de la sonda TM100 y 12 clones de la sonda TM75 se recuperaron en forma de ADNc integrado en el vector fagémido pBluescript SK. La longitud del inserto de estos clones se identificó mediante análisis de endonucleasa de restricción.

6) Determinación de las secuencias de bases

Se determinó la secuencia de nucleótidos total del clon más largo de cada uno de los clones de cDNA anteriores. Inicialmente, ambas secuencias de nucleótidos 5' y 3' del clon se determinaron usando cebadores M13 (Takara) en el ABI PRISM Fluorescence Sequencer (Modelo 310 Genetic Analyzer, Perkin Elmer).

A continuación, se sintetizaron los siguientes cebadores:

TM100inRV: gTC AAg gCg TTA CTC Tgg (SEQ ID NO: 14) basándose en los datos de la secuencia de nucleótidos 5' del clon más largo de TM100 (no según la invención);

TM100inFW: CTg ggT gAg gAT CAC CTC (SEC ID NO: 15) basándose en los datos de la secuencia de nucleótidos 3' del mismo clon (no según la invención);

TM75inRV: gAT gTC TAC gTg CCC TAC (SEC ID NO: 16) basándose en los datos de la secuencia de nucleótidos 5' del clon más largo de TM75; y

TM75inFW: ACg ACT CAg AgA AgA ACT g (SEC ID NO: 17) basándose en los datos de la secuencia de nucleótidos 3' del mismo clon;

y se utilizaron para la secuenciación. De este modo, se determinaron ambas secuencias de ADN de los clones más largos de TM100 y TM75, de modo que se determinó la secuencia de nucleótidos total.

Los resultados mostraron que la proteína antifúngica que codificaba el ADNc de *Pleurotus cornucopiae* (de la sonda TM100) consiste en un total de 671 bases (SEQ ID NO: 1) que codifican 143 aminoácidos (SEQ ID NO: 2). La secuencia de aminoácidos N-terminal determinada a partir de la proteína purificada correspondía a los residuos de aminoácidos 8-76 de la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2. La secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2 y 67 aminoácidos determinados directamente a partir de la proteína purificada eran totalmente idénticos excepto para dos aminoácidos desconocidos (correspondientes a W 65 y S 73 en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2). Esto llevó a la conclusión de que el ADNc clonado deriva de un gen que codifica la proteína antifúngica de *Pleurotus cornucopiae*.

La secuencia N-terminal de la proteína determinada a partir de la secuencia de ADNc no fue idéntica a la secuencia N-terminal de la proteína realmente purificada, es decir, L (leucina) después de 7 aminoácidos tras el codón de iniciación de metionina se localizó en el extremo N-terminal de la proteína purificada. Esto indicó que la proteína antifúngica de *Pleurotus cornucopiae* se tradujo como un precursor en primer lugar y, a continuación, se truncó la secuencia líder N-terminal (7 aminoácidos). El peso molecular medio de la secuencia de aminoácidos de la supuesta proteína madura (una secuencia de 136 aminoácidos 8-143 del SEQ ID NO: 2) fue de 15158,4 según se determinó utilizando un programa de soporte lógico de análisis de secuencia génica GENETYX-WIN versión 3.2 (Software Development Co., Ltd.), y se calculó que el punto isoelectrónico era 6,22. Este peso molecular estuvo de acuerdo con la estimación (15 kDa) de la proteína purificada mediante SDS-PAGE. Además, existieron dos supuestos sitios de glicosilación (N 21 y 71 del SEQ ID NO: 2).

Por otra parte, el ADNc que codifica un homólogo de la proteína antifúngica de *Pleurotus cornucopiae* (de TM75) consiste en un total de 840 bases (SEQ ID NO: 3) que codifica 141 aminoácidos (SEQ ID NO: 4). El ADNc contiene tres codones ATG en el extremo 5', pero cuando comienza la traducción desde el primer y segundo codones ATG, aparece cerca un codón de terminación detrás de ellos y solamente se pueden codificar 12 y 31 aminoácidos. Sólo cuando la traducción comienza desde el tercer codón ATG, se pueden codificar 141 aminoácidos. Un codón de terminación TGA se encuentra en 102 pb aguas arriba de este ATG en el mismo marco de lectura. Por lo tanto, es casi seguro que el tercer ATG es un codón de iniciación.

Se estimó que el peso molecular de la supuesta secuencia de aminoácidos madura (una secuencia de 134 aminoácidos que consiste en los residuos 8-141 de la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 4) era 14732,2, y se calculó que el punto isoelectrónico era 8,62. Existía un supuesto sitio de glicosilación (N 115 del SEQ ID NO: 4). La homología entre la proteína antifúngica de *Pleurotus cornucopiae* de la presente invención y el homólogo fue de 65,5% en aminoácidos y 64,5% en ADN (ORF 72,2%) según se analizó utilizando GENETYX-WIN.

Se realizaron búsquedas de homología a través de bases de datos GenBank usando BLAST para la proteína antifúngica derivada de *Pleurotus cornucopiae* de la presente invención y su gen, así como sus homólogos y proteínas que tienen una secuencia de aminoácidos codificada por los mismos. Las búsquedas de base de datos de la secuencia de aminoácidos de la proteína antifúngica derivada de *Pleurotus cornucopiae* (secuencia de aminoácidos total del SEQ ID NO: 2) encontraron secuencias homólogas tales como estreptavidina v2 de *Streptomyces violaceus* (Número de acceso: Q53533, Bayer et al. (1995) *Biochim Biophys Acta* 1263: págs. 60-66.)

y v1 (Núm. de acceso: Q53532), estreptavidina de *Streptomyces avidinii* (Núm. de acceso: P22629, Argarana et al. (1986) *Nucleic Acids Res* 14: págs. 1871-1882), etc. Las homologías de estas tres secuencias se extienden sobre 128 aminoácidos, y fueron 50%, 49% y 49%, respectivamente. También se emparejaron avidina de clara de huevo (Gope et al. (1987) *Nucleic Acids Res* 15: págs. 3595-3606) y varias proteínas relacionadas con avidina (Keinanen et al. (1994) *Eur J Biochem* 220: págs. 615-621) con menores grados de homología. También se emparejó un núcleo de estreptavidina mutante w79f ChainB (Freitag et al. (1997) *Protein Sci.* 6: págs. 1157-1166), que difiere de la estreptavidina en solo un aminoácido y en el que se truncan 36 aminoácidos N-terminales y 20 aminoácidos C-terminales de la estreptavidina. La homología fue de 51,7%.

Estos hechos indican que esta proteína es una nueva proteína. Las búsquedas de bases de datos de la secuencia de aminoácidos de la proteína antifúngica derivada de *Pleurotus cornucopiae* de la presente invención (secuencia de aminoácidos total del SEQ ID NO: 4) mostraron grados de homología de 50%, 48% y 48% con estreptavidina v2, v1 y estreptavidina, respectivamente.

Sin embargo, las búsquedas de bases de datos similares usando la secuencia de ADN de un gen que codifica la primera proteína antifúngica derivada de *Pleurotus cornucopiae* (71-502 del SEQ ID NO: 1) y la secuencia de ADN de un gen que codifica la segunda proteína antifúngica derivada de *Pleurotus cornucopiae* (226-651 del SEQ ID NO: 3) encontraron solamente varias secuencias que muestran homología en un intervalo muy corto (23 pb) pero no la secuencia de ADN de la estreptavidina. Esto significa que las secuencias de ADN que codifican las nuevas proteínas de la presente invención no son altamente homólogas a la secuencia de ADN de la estreptavidina a nivel de ADN.

La presente proteína antifúngica fue denominada "tamavidina" debido a que era una nueva proteína de tipo estreptavidina purificado de un hongo comestible *Pleurotus cornucopiae* (Tamogitake). El gen derivado de la proteína purificada se denomina tam1, la proteína que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por el mismo se denomina tamavidina 1, un homólogo de tam1 se denomina tam 2, y la proteína que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por el mismo se denomina tamavidina 2. Cuando se utilizó un programa de soporte lógico de análisis de la secuencia genética GENETYX-WIN versión 3.2 para analizar la homología de las secuencias de aminoácidos totales de las proteínas antifúngicas de *Pleurotus cornucopiae* de la presente invención con respecto a la estreptavidina (que difiere de las estreptavidinas v2 y v1 en solamente 9 aminoácidos y 1 de aminoácidos, respectivamente), la secuencia de aminoácidos de la tamavidina 1 codificada por tam1 mostró una homología (identidad de aminoácidos) de 46,7% y la secuencia de aminoácidos de la tamavidina 2 codificada por tam2 mostró 48,1%. La homología de la secuencia de ADN total (SEC ID NO: 1 y 3) con respecto a la estreptavidina fue de 53,8% (ORF 56,8%) para tam1 y 51,0% (ORF 57,3%) para tam2. La homología de la proteína antifúngica de *Pleurotus cornucopiae* codificada por tam1 con respecto a la avidina de clara de huevo fue de 31,2% en la secuencia de aminoácidos y 42,4% en la secuencia de ADN, y la homología de la proteína antifúngica de *Pleurotus cornucopiae* codificada por tam2 con respecto a la avidina de clara de huevo fue de 36,2% en la amino secuencia de aminoácidos y 41,8% en la secuencia de ADN.

Se preparó un árbol taxonómico molecular de las secuencias de aminoácidos de las regiones de proteína madura de tamavidina 1, tamavidina 2, estreptavidina, estreptavidina V1, estreptavidina V2 y avidina mediante el método UPGMA usando GENETYX-WIN. Los resultados mostraron que la tamavidina 1 y la tamavidina 2 forman un tercer grupo distinto del grupo de la estreptavidina y el grupo de la avidina como se muestra en la FIG. 7.

En comparación con la estreptavidina, la tamavidina 1 y la tamavidina 2 de la presente invención se truncan en 33 aminoácidos N-terminales, pero se conservan todos los residuos de triptófano (W) (Gitlin et al. (1988) *Biochem. J* 256: págs. 279-282) y residuos de tirosina (Y) (Gitlin et al. (1990) *Biochem. J* 269: págs. 527-530) posiblemente implicados en la unión a biotina (Y 34 y 45 y W 82, 98 y 110 en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2, e Y 34 y 45 y W 80, 96 y 108 en la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 4).

Se calculó que los pesos moleculares medios de las regiones que se suponen regiones de proteínas maduras (tramos 8-143 de la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2, y 8-141 de la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 4) eran 15158,4 y 14732,2, respectivamente, cerca de los pesos moleculares medios de la estreptavidina madura y la avidina madura (16490,6 y 14342,9, respectivamente). Estos hechos sugieren fuertemente que no sólo la tamavidina 1 codificada por tam1 sino también la tamavidina 2 codificada por tam2 es una proteína que tiene afinidad de unión a biotina.

Ejemplo 4: Experimentos de supresión de una actividad antifúngica mediante biotilación

Las proteínas antifúngicas de la presente invención son nuevas proteínas similares a la estreptavidina, lo que sugiere que se unen a una de las vitaminas, D-biotina (vitamina H, Katayama Chemical). Se sabe que el añublo del arroz requiere biotina para su crecimiento. Estos hechos sugieren que la presente proteína antifúngica se une a la biotina libre presente en el medio de ensayo para inducir deficiencia de biotina en los medios, con el resultado de que se inhibe el crecimiento del añublo del arroz (M. grisea).

La Fig. 8 muestra los resultados de experimentos de supresión de una actividad antifúngica mediante adición de biotina. Específicamente, se colocaron esporas de *M. grisea* suspendidas en 1/2 PD en placas de microtitulación. Los pocillos que contenían 50 ng/ml o 1000 ng/ml de tamavidina 1 purificada (no de acuerdo con la invención), o los pocillos que contenían 1000 ng/ml de tamavidina 1 y 100 ng/ml de biotina, o los pocillos de control que no contenían proteína se prepararon y se incubaron a 28°C durante 48 horas.

Como resultado, la extensión de las hifas de *M. grisea* se inhibió bastante en los pocillos que contenían tamavidina 1 incluso a una concentración de 50 ng/ml como se muestra en la FIG. 8. Sin embargo, las hifas se extendieron normalmente en los pocillos que contenían tanto tamavidina 1 (1000 ng/ml) como biotina y los pocillos de control. Por lo tanto, se anuló realmente una actividad antifúngica de la proteína antifúngica mediante la adición de biotina en exceso al medio de análisis. Esto es debido probablemente a que una cierta parte de la biotina añadida en exceso se unió a la mayor parte de tamavidina 1 utilizada para el análisis para inactivar su actividad antifúngica.

Se realizaron pruebas similares en avidina de clara de huevo asequible comercialmente (Sigma) y estreptavidina de *Streptomyces avidinii* (Sigma) a una concentración de 1000 ng/ml. Los resultados mostraron que ambas proteínas tenían la actividad antifúngica contra *M. grisea* y la actividad fue anulada por la biotina (Fig. 8).

Ejemplo 5: Actividad de unión a biotina de la proteína recombinante tamavidina 2

1) Construcción de un vector de expresión

Las evaluaciones se realizaron para saber si tamavidina 2 codificada por el gen tam2, que es un gen aislado como un homólogo del gen tam1 de la presente invención, muestra en la práctica o no la actividad de unión a biotina. Específicamente, el gen tam2 se insertó en *E. coli* para expresar la tamavidina 2 recombinante y se examinó para saber si esta proteína se purifica o no en una columna de iminobiotina.

Inicialmente, se sintetizó un par de cebadores para amplificar el ORF total de gen tam2 obtenido en el Ejemplo 3 (bases 226-651 del SEQ ID NO: 3 en la Lista de Secuencias) mediante PCR.

TM75Bsp5: 5'-ACCAACATgTCAGACgTTCAA-3' (SEC ID NO: 18)

TM75Hin3: 5'-ATGAAAGCTTTACTTCAACCTCgg-3' (SEQ ID NO: 19).

TM75Bsp5 contiene un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción BspLU III (subrayado) y TM75Hin3 contiene un sitio de reconocimiento de la endonucleasa de restricción HindIII (subrayado), respectivamente. Estos cebadores se utilizaron para realizar la PCR en un plásmido que contenía el gen tam2 (pBluescript, Ejemplo 3 (6)) como molde. Utilizando un sistema de control de temperatura programado PC-700 (ASTEK), se hicieron circular 50 µl de una solución de reacción que contenía 500 ng de ADN plasmídico molde, 5 µl de 10 x tampón Pyrobest, 4 µl de cada dNTP 2,5 mM, 10 pmoles de cada cebador y 0,5 µl de ADN polimerasa Pyrobest (Takara) en 1 ciclo a 94°C durante 3 min, 15 ciclos a 94°C durante 1 min, 50°C durante 1 min y 72°C durante 1 min, y a continuación 1 ciclo a 72°C durante 6 minutos.

El producto de PCR resultante se digirió doblemente con endonucleasas de restricción BspLU 11I (Roche) y HindIII (Takara) y se sometió a purificación en gel. El vector de expresión de *E. coli* utilizado fue pTrc99A (Pharmacia LKB). Este vector se digirió doblemente con NcoI (Takara) y HindIII y se purificó en gel y se ligó con el producto de PCR tratado con endonucleasas de restricción como antes, y a continuación se insertó en *E. coli* TB1. Se confirmó la secuencia de nucleótidos del gen tam2 insertado.

2) Expresión de la proteína recombinante y purificación en una columna de biotina

Una sola colonia de *E. coli* que portaba el vector de expresión pTrc99A que contenía tam2 TB1 se inoculó en medio LB que contenía un antibiótico ampicilina y se precultivó para que alcanzara aproximadamente $DO_{600} = 0,5$. A continuación, se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM para inducir la expresión de la proteína y las células se cultivaron mediante agitación a 37°C durante otras 4,5 horas. El volumen de cultivo fue de 50 ml y también se sometió a ensayo un control sin IPTG (isopropil-β-D (-)-tiogalactopiranosido, Wako Pure Chemical Industries). Las células cultivadas se recogieron mediante centrifugación y se almacenaron a -80°C hasta la purificación de la proteína.

La tamavidina 2 se purificó en iminobiotina remitiéndose al método de Hofmann et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4666-4668 (1980)). Las células se suspendieron en 1,5 ml de tampón A (CAPS 50 mM (ácido 3-[ciclohexilamino]-1-propanosulfónico, SIGMA), pH 11, NaCl 50 mM) y se rompieron mediante sonicación. Después de la centrifugación, el sobrenadante se recogió como proteína soluble total. Una columna con un diámetro de 0,5 cm y una altura de 5 cm se cargó con 0,5 ml de 2-Iminobiotina-Agarosa (SIGMA) y se equilibró con tampón A. La proteína soluble total se cargó en esta columna de iminobiotina-agarosa. Después la columna se lavó con 5 ml de CAPS 50 mM pH 11, NaCl 500 mM, la tamavidina 2 se eluyó con 1,5 ml de NH_4OAC 50 mM, pH 4,0. La proteína soluble total y la fracción que había de haber pasado a través de la columna, la fracción de lavado y la fracción de elución se sometieron a electroforesis en SDS-PAGE en PAGEL (ATTO) al 15%.

Después de la migración, la proteína se tiñó con Azul Brillante de Coomassie R-250 (Wako Pure Chemical Industries). Los resultados se muestran en la FIG. 9. Como se muestra en la FIG. 9, la fracción de proteína soluble total inducida por IPTG 1 mM (T) mostró una banda de alrededor de 15 kDa, que no se encontró en la fracción no inducida (C). Este peso molecular coincidió con el peso molecular de 15467 deducido a partir de 141 aminoácidos codificados por el gen tam2.

Además, esta proteína de 15 kDa apareció en la fracción eluida con NH₄OAC 50 mM, pH 4,0 (E), pero no en la fracción que había pasado a través de la columna de biotina (F) y la fracción de lavado de la columna (W). La proteína de 15 kDa formó un elemento importante en la fracción de elución. Este resultado muestra que la tamavidina 2 codificada por tam2 se une a biotina. El resultado también muestra que ésta se puede purificar convenientemente mediante el método mostrado anteriormente. El rendimiento de tamavidina 2 recombinante expresada en E. coli obtenido a partir de un volumen de cultivo de 50 ml fue de aproximadamente 1 mg.

15 Efectos

Se puede esperar que las formulaciones que contienen como ingrediente activo un elemento proteico caracterizado por comprender un polipéptido constituido por la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 4 o un polipéptido constituido por una secuencia parcial de la misma y capaz de unirse a biotina o un derivado del mismo de acuerdo con la presente invención tengan uso como agentes antifúngicos.

También se pueden crear plantas resistentes a enfermedades integrando un ADN que tiene la secuencia de 226-651 o 247-651 del SEQ ID NO: 3 de la presente invención en un casete de expresión que contiene un promotor constitutivo adecuado funcional en una célula vegetal, un promotor específico de órgano/tiempo o una secuencia promotora inducible en respuesta a estrés o las plagas y una secuencia terminadora funcional en la célula vegetal y a continuación introduciendo de el casete en la célula vegetal para proporcionar un individuo regenerado. En este caso, también se puede conectar una secuencia de ADN que codifica una secuencia señal para el transporte a pequeños órganos celulares o una secuencia señal para la secreción extracelular a la secuencia de ADN que codifica la proteína antifúngica de la presente invención.

Las proteínas de la presente invención pueden ser producidos y preparadas en masa en células de E. coli, levaduras, plantas, insectos o animales tales como Xenopus integrando una secuencia de ADN que codifica la proteína de la presente invención en un vector de expresión capaz de expresar proteínas foráneas en las células. En este caso, también se puede conectar una secuencia de ADN que codifica una secuencia señal para el transporte a pequeños órganos celulares o una secuencia señal para la secreción extracelular a la secuencia de ADN que codifica la proteína antifúngica de la presente invención.

La fuerte interacción entre las proteínas de la presente invención y la biotina puede aplicarse a diversas técnicas analíticas que actualmente se utilizan ampliamente con estreptavidina y avidina.

40 **Lista de Secuencias**

- <110> JAPAN TOBACCO INC. y Syngenta Limited
- <120> Una nueva proteína, un gen que la codifica, y un método para su uso
- <130> YCT697
- <160> 19
- <210> 1
- <211> 671
- <212> ADN
- <213> Pleurotus cornucopiae
- <220>
- <221> CDS
- <222> (71)...(502)

ES 2 435 777 T3

<400> 1
gcccagagag accatctata acctctgcgt ccaaacccttc attgaaagct tcaacccccca
60
gtcccccatc atg aaa gac gtc caa tct ctc ctc acc gga acc tgg tac
109
Met Lys Asp Val Gln Ser Leu Leu Thr Gly Thr Trp Tyr
1 5 10
aat gaa ctc ggc tca aca atg aat ttg act gca aat aaa gac ggt tcg
157
Asn Glu Leu Gly Ser Thr MET Asn Leu Thr Ala Asn Lys Asp Gly Ser
15 20 25
ctc acc gga acg tac cac tcc aac gtc ggc gag gtt ccc cca act tat
205
Leu Thr Gly Thr Tyr His Ser Asn Val Gly Glu Val Pro Pro Thr Tyr
30 35 40 45
cac ctt tct ggc cgg tac aac ctc cag ccc ccc tcg ggt caa ggc gtt
253
His Leu Ser Gly Arg Tyr Asn Leu Gln Pro Pro Ser Gly Gln Gly Val
50 55 60
act ctg gga tgg gcg gtg tct ttc gaa aac act agt gcg aat gtt cat
301
Thr Leu Gly Trp Ala Val Ser Phe Glu Asn Thr Ser Ala Asn Val His
65 70 75
tct gtc tca aca tgg agc ggg cag tac ttc tct gaa ccc gcc gag gtg
349
Ser Val Ser Thr Trp Ser Gly Gln Tyr Phe Ser Glu Pro Ala Glu Val
80 85 90
atc ctc acc cag tgg ctg ttg tca agg agc tct gag cgc gaa gat ttg
397
Ile Leu Thr Gln Trp Leu Leu Ser Arg Ser Ser Glu Arg Glu Asp Leu
95 100 105
tgg cag tcc acc cat gtg ggg cat gat gag ttc agc aag aca aag cca
445
Trp Gln Ser Thr His Val Gly His Asp Glu Phe Ser Lys Thr Lys Pro
110 115 120 125
acc aag gag aag att gcc cag gct caa ctc ctt cgt cgc ggg ttg aag
493
Thr Lys Glu Lys Ile Ala Gln Ala Gln Leu Leu Arg Arg Gly Leu Lys
130 135 140
ttc gag tga acctgattca cgaaaaattc cgtctatcca acgttggaga tgactccac
551
Phe Glu
143
ctcaagttgt gaatgtttgc tcatttgtac cgaatctgta cgacaagttt gtctgccacc
611
atgtacatcg caaagaatta tcaagaaact ccatgacctg ccaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
671
<210> 2
<211> 143
<212> PRT
<213> Pleurotus cornucopiae

5

ES 2 435 777 T3

<400> 2
 Met Lys Asp Val Gln Ser Leu Leu Thr Gly Thr Trp Tyr
 1 5 10
 Asn Glu Leu Gly Ser Thr MET Asn Leu Thr Ala Asn Lys Asp Gly Ser
 15 20 25
 Leu Thr Gly Thr Tyr His Ser Asn Val Gly Glu Val Pro Pro Thr Tyr
 30 35 40 45
 His Leu Ser Gly Arg Tyr Asn Leu Gln Pro Ser Gly Gln Gly Val
 50 55 60
 Thr Leu Gly Trp Ala Val Ser Phe Glu Asn Thr Ser Ala Asn Val His
 65 70 75
 Ser Val Ser Thr Trp Ser Gly Gln Tyr Phe Ser Glu Pro Ala Glu Val
 80 85 90
 Ile Leu Thr Gln Trp Leu Leu Ser Arg Ser Ser Glu Arg Glu Asp Leu
 95 100 105
 Trp Gln Ser Thr His Val Gly His Asp Glu Phe Ser Lys Thr Lys Pro
 110 115 120 125
 Thr Lys Glu Lys Ile Ala Gln Ala Gln Leu Leu Arg Arg Gly Leu Lys
 130 135 140
 Phe Glu
 143
 <210> 3
 <211> 840
 <212> ADN
 <213> Pleurotus cornucopiae
 <220>
 <221> CDS
 <222> (226)...(651)

5

ES 2 435 777 T3

<400> 3

gtggactctt gcgcgggcag gtacattcac aggtcgtgca ggttgtggga gtattcagtg
60
gctcagactc ttgtgctgac gggatatagat tcacaagccg tgcaggttgt gggagtactc
120
agagggtgag tgattgaatg gaagcacatc ggcgctgggt tcaagccgag aattgaggaa
180
gtaatactcc aagccgatga gaggttacag agatcctcta ccacc atg tca gac gtt
237

Met Ser Asp Val
1

caa tct tca ctc acc gga acc tgg tac aat gaa ctc aac tcc aag atg
285

Gln Ser Ser Leu Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Glu Leu Asn Ser Lys Met
5 10 15 20

gaa ttg act gca aac aaa gac ggt act ctc act gga aag tac ctc tcc
333

Glu Leu Thr Ala Asn Lys Asp Gly Thr Leu Thr Gly Lys Tyr Leu Ser
25 30 35

aaa gtt ggg gat gtc tac gtg ccc tac cca ctc tct ggt cgc tat aac
381

Lys Val Gly Asp Val Tyr Val Pro Tyr Pro Leu Ser Gly Arg Tyr Asn
40 45 50

ctc caa ccc ccc gcg gga caa ggc gtc gct ctt ggg tgg gcg gta tcc
429

Leu Gln Pro Pro Ala Gly Gln Gly Val Ala Leu Gly Trp Ala Val Ser
55 60 65

tgg gag aac agt aaa att cat tcc gct acg aca tgg agc gga cag ttc
477

Trp Glu Asn Ser Lys Ile His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Phe
70 75 80

ttc tct gag tcg tct cca gtg att ctt act cag tgg ttg ttg tca tcg
525

Phe Ser Glu Ser Ser Pro Val Ile Leu Thr Gln Trp Leu Leu Ser Ser
85 90 95 100

agc act gcg cgt ggg gac gta tgg gaa tcc aca ctt gtg ggg aat gat
573

Ser Thr Ala Arg Gly Asp Val Trp Glu Ser Thr Leu Val Gly Asn Asp
105 110 115

ES 2 435 777 T3

tcg ttt aca aag acg gcg ccg act gag cag cag atc gct cat gct caa
 621
 Ser Phe Thr Lys Thr Ala Pro Thr Glu Gln Gln Ile Ala His Ala Gln
 120 125 130

ctc cat tgt cgc gca ccg agg ttg aag taa cgagggtcat cgcaaacaaa ccc
 674
 Leu His Cys Arg Ala Pro Arg Leu Lys
 135 140 141

catcgggtctt gaccggtgat ccaaccccaa ggtctaataca atgccggatg actccatttg
 734
 aggatgtgaa ttagttgcca tttgtatgac ttgatttgtc tgttgtgtag tatcggatta
 794
 agaatcacat ctcgtaacc ttcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa
 840

<210> 4
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> Pleurotus cornucopiae
 <400> 4
 Met Ser Asp Val

5

1
 Gln Ser Ser Leu Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Glu Leu Asn Ser Lys Met
 5 10 15 20
 Glu Leu Thr Ala Asn Lys Asp Gly Thr Leu Thr Gly Lys Tyr Leu Ser
 25 30 35
 Lys Val Gly Asp Val Tyr Val Pro Tyr Pro Leu Ser Gly Arg Tyr Asn
 40 45 50
 Leu Gln Pro Pro Ala Gly Gln Gly Val Ala Leu Gly Trp Ala Val Ser
 55 60 65
 Trp Glu Asn Ser Lys Ile His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Phe
 70 75 80
 Phe Ser Glu Ser Ser Pro Val Ile Leu Thr Gln Trp Leu Leu Ser Ser
 85 90 95 100
 Ser Thr Ala Arg Gly Asp Val Trp Glu Ser Thr Leu Val Gly Asn Asp
 105 110 115
 Ser Phe Thr Lys Thr Ala Pro Thr Glu Gln Gln Ile Ala His Ala Gln
 120 125 130
 Leu His Cys Arg Ala Pro Arg Leu Lys
 135 140 141

10

<210> 5
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Pleurotus cornucopiae
 <220>

15

<223> Xaa representa un residuo de aminoácido desconocido
 <400> 5
 Leu Xaa Gly Xaa Trp Tyr Asn Glu Leu Gly Xaa Xaa Met Asn Leu Thr
 1 5 10 15
 Ala Asn Lys Asp Gly Ser Leu Xaa Gly Thr Tyr His Ser Asn Val Gly
 20 25 30
 Glu Val Pro Xaa Xaa Tyr His Leu Ala Gly Arg Tyr
 35 40 44

20

<210> 6
 <211> 50
 <212> PRT
 <213> Pleurotus cornucopiae
 <220>
 <223> Xaa representa un residuo de aminoácido desconocido

ES 2 435 777 T3

<400> 6
 Asp Gly Ser Leu Thr Gly Thr Tyr His Ser Asn Val Gly Glu Val Pro
 1 5 10 15
 Pro Thr Tyr His Leu Ser Gly Arg Tyr Asn Leu Gln Pro Pro Ser Gly
 20 25 30
 Gln Gly Val Thr Leu Gly Xaa Ala Val Ser Phe Glu Asn Thr Xaa Ala
 35 40 45
 Asn Val
 50
 <210> 7
 <211> 21
 5 <212> PRT
 <213> Pleurotus cornucopiae
 <220>
 <223> Xaa representa un residuo de aminoácido desconocido
 <400> 7
 Leu Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Glu Leu Gly Ser Thr Met Asn Leu Thr
 1 5 10 15
 Ala Asn Lys Asp Gly
 20 21
 10 <210> 8
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Pleurotus cornucopiae
 15 <220>
 <223> Xaa representa un residuo de aminoácido desconocido
 <400> 8
 Leu Thr Gly Thr Xaa Tyr Asn Glu Leu Gly Ser Thr Xaa Asn Leu Thr
 1 5 10 15
 Ala Asn Xaa Asp Gly Xaa Leu
 20 23
 20 <210> 9
 <211> 69
 <212> PRT
 <213> Pleurotus cornucopiae
 25 <220>
 <223> Xaa representa un residuo de aminoácido desconocido
 <400> 9
 Leu Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Glu Leu Gly Ser Thr Met Asn Leu Thr
 1 5 10 15
 Ala Asn Lys Asp Gly Ser Leu Thr Gly Thr Tyr His Ser Asn Val Gly
 20 25 30
 Glu Val Pro Pro Thr Tyr His Leu Ser Gly Arg Tyr Asn Leu Gln Pro
 35 40 45
 Pro Ser Gly Gln Gly Val Thr Leu Gly Xaa Ala Val Ser Phe Glu Asn
 50 55 60
 Thr Xaa Ala Asn Val
 65
 30 <210> 10
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <400> 10
 acngnacnt ggtayaayg
 35 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <222> 6 y 9
 <223> i representa inosina

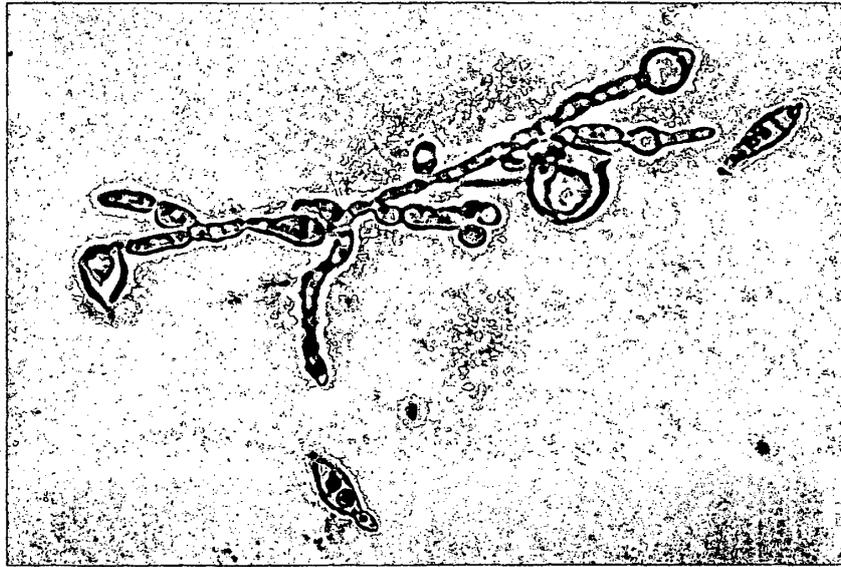
<400> 11
 garytigiw snacnatgaa
 <210> 12
 <211> 18
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <222> 12 y 15
 <223> i representa inosina
 10 <400> 12
 gtrtitycra aiswiacn
 <210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <222> 3 y 6
 <223> i representa inosina
 <400> 13
 20 cciairigtna cncctygncc
 <210> 14
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <400> 14
 gtcaaggcgt tactctgg
 <210> 15
 <211> 18
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <400> 15
 ctgggtgagg atcacctc
 <210> 16
 <211> 18
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <400> 16
 gatgtctacg tgcctac
 <210> 17
 40 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <400> 17
 acgactcaga gaagaactg
 45 <210> 18
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <400> 18
 50 accaacaatgt cagacgttca a
 <210> 19
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <400> 19
 atgaaagctt ttacttcaac ctcgg

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína que muestra una actividad de unión a biotina, en donde dicha proteína tiene una secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 4, o una secuencia de aminoácidos con 80% o más de homología con dichas secuencias.
2. La proteína de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene una secuencia de aminoácidos con 90% o más de homología con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 4.
- 10 3. La proteína de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene una secuencia de aminoácidos con 95% o más de homología con la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 4.
- 15 4. Una proteína que consiste en un polipéptido, en donde dicho polipéptido se selecciona a partir de un polipéptido que consiste en la secuencia parcial de aminoácidos 8-141 del SEQ ID NO: 4, y un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con 80% o más de homología con la secuencia parcial de aminoácidos 8-141 del SEQ ID NO: 4 en donde dichos polipéptidos muestran una actividad de unión a biotina.
- 20 5. Una proteína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que es soluble en solución acuosa.
6. Un gen que codifica la proteína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
- 25 7. El gen de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicho gen tiene una secuencia de bases de las bases 226-651 del SEQ ID NO: 3, o una secuencia de bases que puede hibridar con la secuencia de bases anterior en condiciones rigurosas (NaHPO₄ 0,5 M (pH 7,2), SDS al 7%, EDTA 1 mM a 65°C).
- 30 8. Un gen que codifica una proteína que exhibe una actividad de unión a biotina, en donde dicho gen tiene una secuencia de bases de las bases 226-651 del SEQ ID NO: 3, o una secuencia de bases que puede hibridar con la secuencia de bases anterior en condiciones rigurosas (NaHPO₄ 0,5 M (pH 7,2), SDS al 7%, EDTA 1 mM a 65°C).
- 35 9. El gen de una cualquiera de las reivindicaciones 6-8, que tiene una secuencia de bases con 80% o más de homología con la secuencia de bases de las bases 226-651 del SEQ ID NO: 3.
10. El gen de una cualquiera de las reivindicaciones 6-8, que tiene una secuencia de bases con 90% o más de homología con la secuencia de bases de las bases 226-651 del SEQ ID NO: 3.
- 40 11. El gen de una cualquiera de las Reivindicaciones 6-8, que tiene una secuencia de bases con 95% o más de homología con la secuencia de bases de las bases 226-651 del SEQ ID NO: 3.
- 45 12. Un oligonucleótido para obtener un gen que codifica una proteína de unión a biotina de *Pleurotus cornucopiae*, que tiene una secuencia de nucleótidos descrita en una cualquiera de los SEQ ID NO: 16-19.
- 50 13. Un método para aislar el gen de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-11, que comprende: realizar una reacción de amplificación de ácido nucleico utilizando dos tipos de oligonucleótidos descritos en la Reivindicación 12 como par de cebadores y una biblioteca de ADNc del cuerpo fructífero de *Pleurotus cornucopiae* como molde para amplificar una porción del gen que codifica la proteína de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1-5; y explorar dicha biblioteca de ADNc mediante el uso del producto de amplificación obtenido de este modo como sonda para aislar el clon de ADNc completo.
- 55 14. Un vector recombinante que comprende el gen de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-11.
15. El vector recombinante de acuerdo con la reivindicación 14, que es un vector de expresión.
- 60 16. Una célula anfitriona transformada, que se obtiene introduciendo el vector recombinante de la reivindicación 14 o 15 a un organismo anfitrión no humano.
17. Una proteína recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, producido por la célula anfitriona transformada de la reivindicación 16.
18. Un método para producir una proteína de unión a biotina que comprende transformar células anfitrionas por el gen de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-11 y recuperar la proteína de unión a biotina de las fracciones solubles obtenidas a partir de las células anfitrionas rotas.

19. El método para producir una proteína de unión a biotina de acuerdo con la reivindicación 18, **caracterizado porque** comprende una etapa de una purificación por afinidad mediante el uso de un análogo de biotina.

FIG. 1



Á

FIG. 2

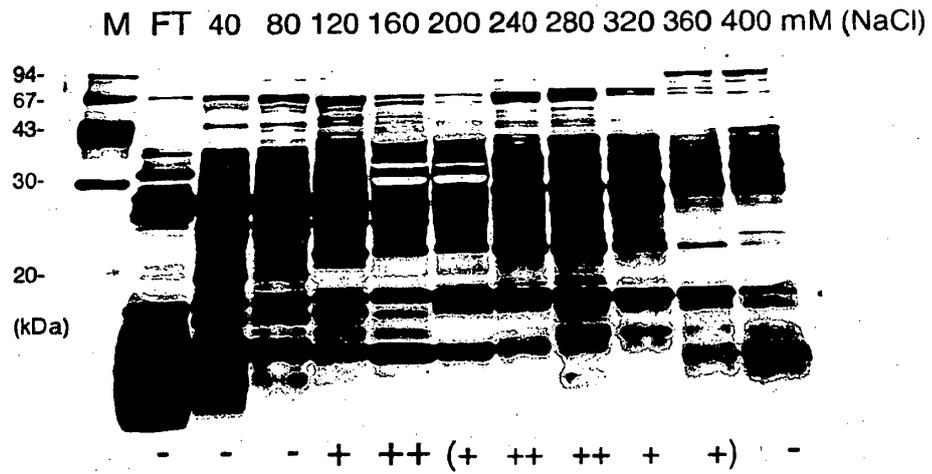


FIG. 3

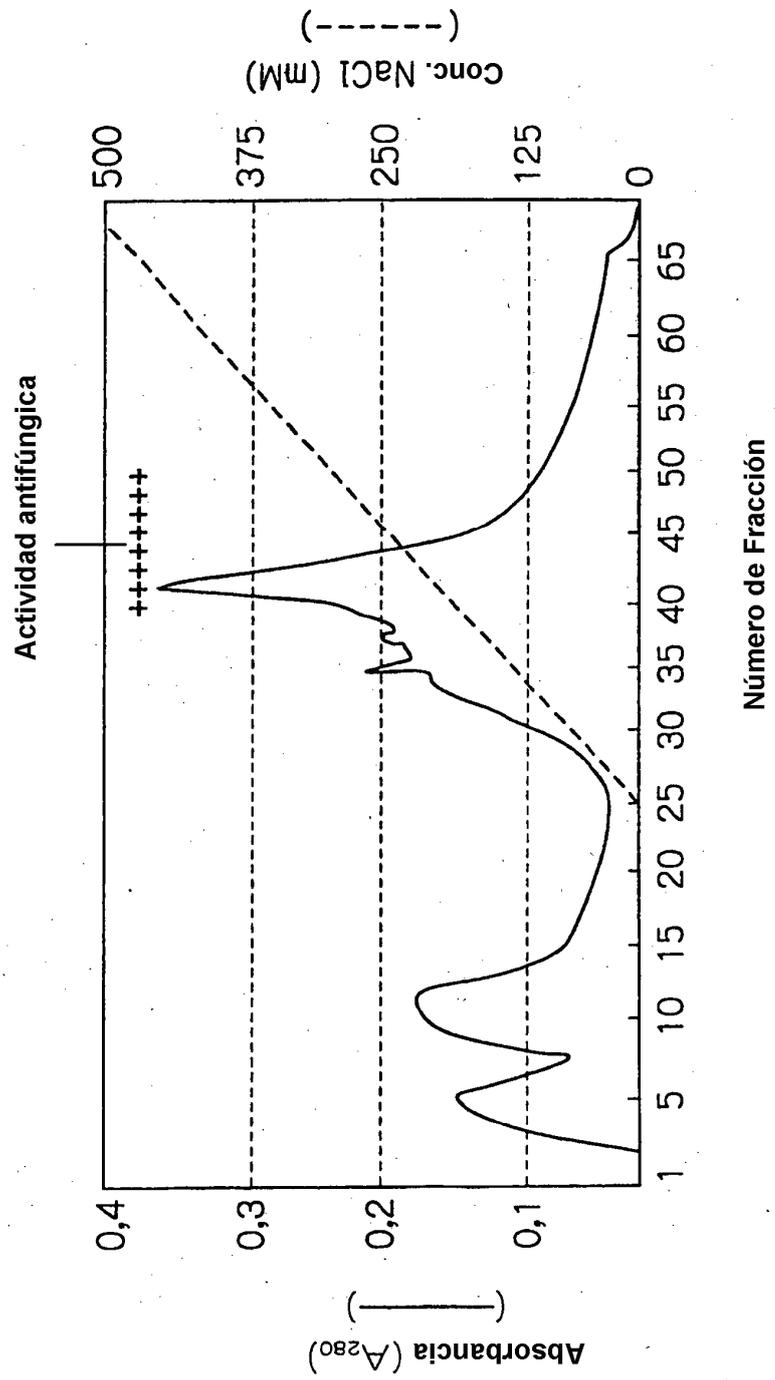


FIG. 4

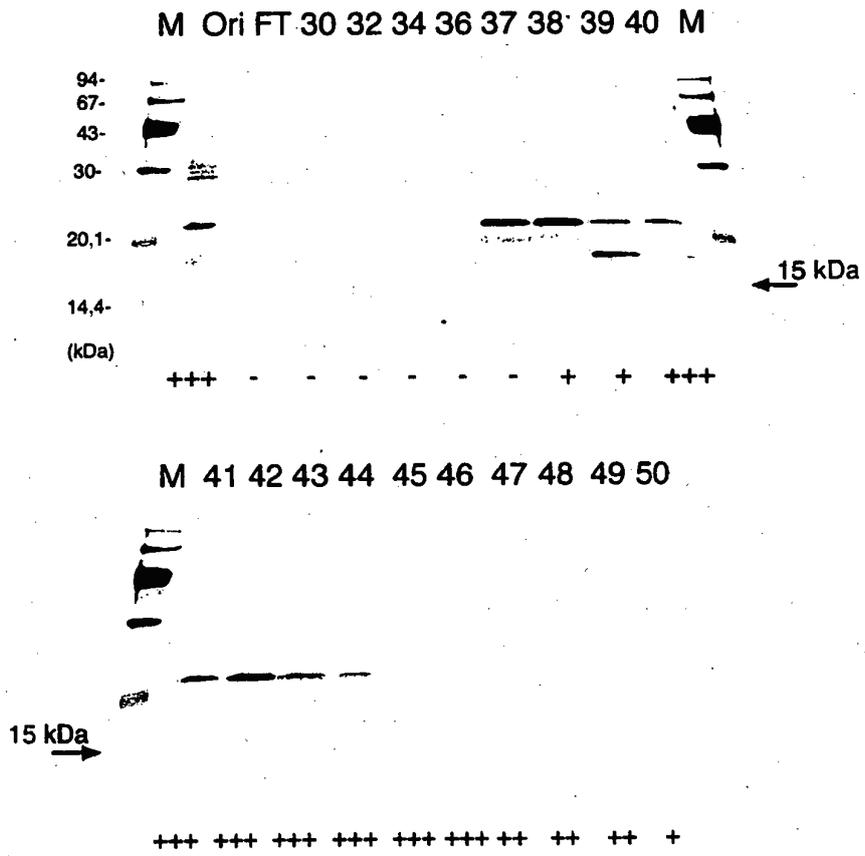


FIG. 5

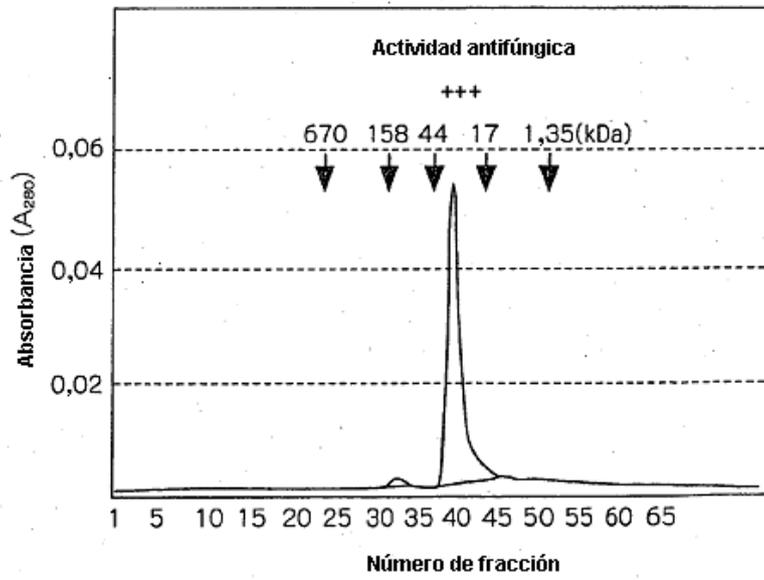


FIG. 6

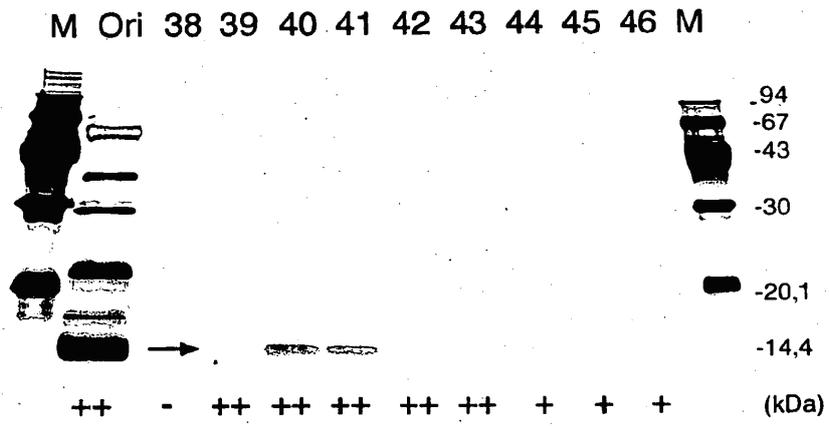


FIG. 7

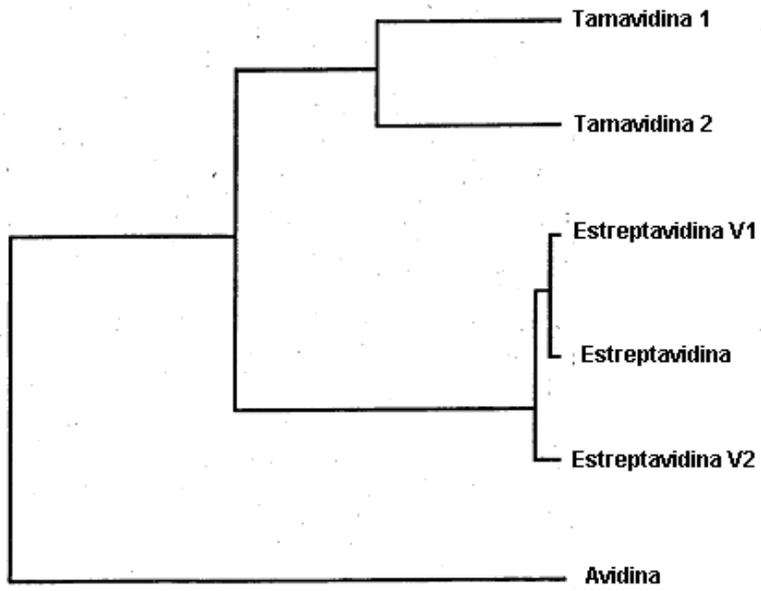


FIG. 8

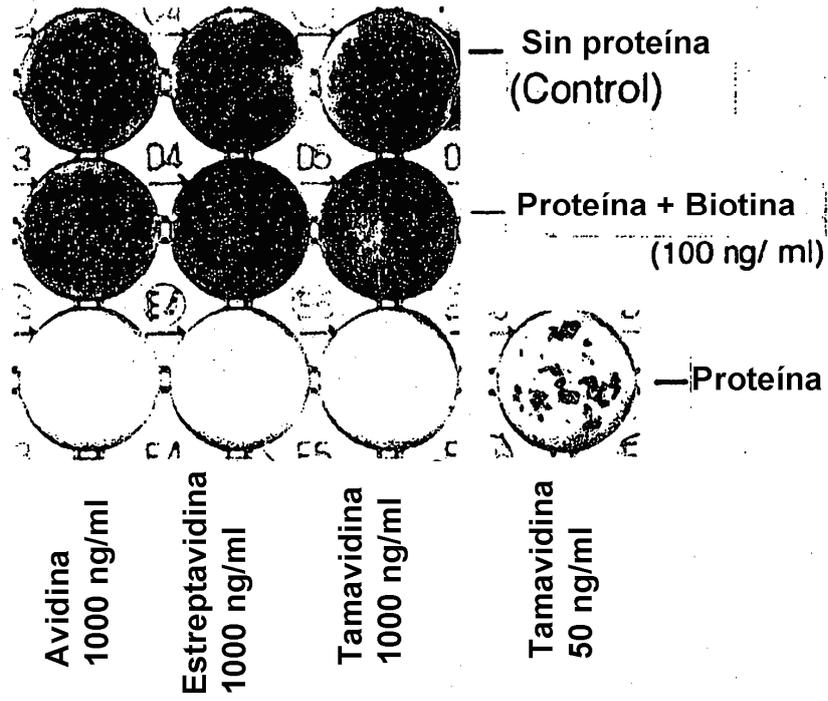
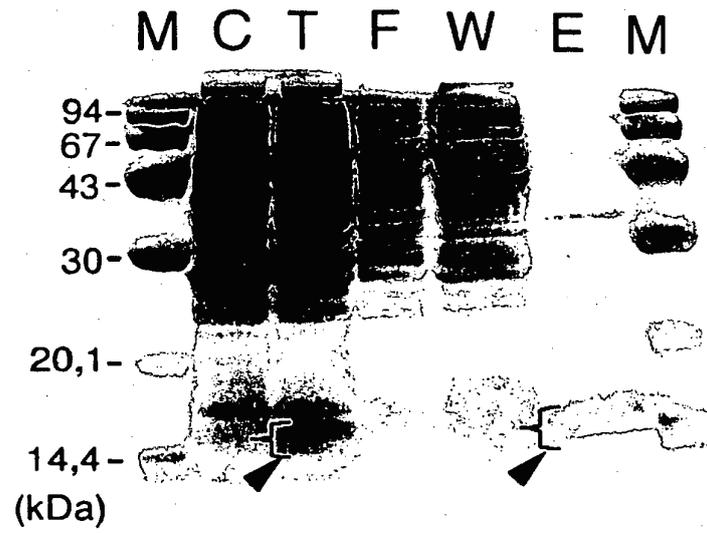


FIG. 9



Á