



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 315 666**

51 Int. Cl.:

C12N 9/58 (2006.01)

C12N 9/52 (2006.01)

C12N 15/57 (2006.01)

A23J 3/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04738929 .1**

96 Fecha de presentación : **21.06.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1639105**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.03.2006**

54 Título: **Proteasas.**

30 Prioridad: **19.06.2003 DK 2003 00912**
19.06.2003 DK 2003 00913
10.10.2003 DK 2003 01494
10.10.2003 DK 2003 01492
10.10.2003 DK 2003 01493
01.03.2004 DK 2004 00331
01.03.2004 DK 2004 00333
01.03.2004 DK 2003 00332

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2009

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

72 Inventor/es: **Lassen, Soren, Flensted;**
Sjoholm, Carsten;
Ostergaard, Peter, Rahbek;
Andersen, Carsten y
Fischer, Morten

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

ES 2 315 666 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

Proteasas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un polipéptido aislado que tiene una actividad proteasa y es homólogo de las proteasas de *Nocardiopsis*, así como de secuencias de ácido nucleico aisladas codificantes de éste. La invención se refiere también a constructos de ácido nucleico, vectores, y a células huéspedes, incluyendo plantas transgénicas y animales no humanos, comprendiendo esas secuencias de ácidos nucleicos, así como métodos de producción y uso de la proteasa, en particular en alimentos para animales, por ejemplo en alimentos para peces.

La proteasa de la invención es termoestable, y se exponen unas cualidades estructurales características relevantes para la termoestabilidad de las proteasas de la familia peptidasa S2A o S1E.

La proteasa de la invención degrada eficazmente también el inhibidor de soja Bowman-Birk, así como otros factores antinutritivos como la aglutinina de soja, y el inhibidor de tripsina Kunitz, así como las proteínas de almacenamiento de soja aisladas como la glicinina y la beta-conglicinina.

20 **Antecedentes de la invención**

Las proteasas derivadas de la especie *Nocardiopsis* NRRL 18262 y *Nocardiopsis dassonvillei* NRRL 18133 son descritas en WO 88/03947. Las secuencias de ADN y aminoácidos de la proteasa derivada de la especie *Nocardiopsis* NRRL 18262 son mostrados en la solicitud DK N°. 1996 00013. WO 01/58276 expone el uso en alimentos para animales de proteasas estables al ácido relacionadas con las proteasas derivadas de la especie *Nocardiopsis* NRRL 18262, así como una proteasa derivada de *Nocardiopsis alba* DSM 14010. No obstante, estas proteasas no son termoestables.

JP 2-255081-A expone una proteasa derivada de una cepa de especie *Nocardiopsis* OPC-210 (FERM P-10508), aunque sin información de secuencia. La cepa ya no está disponible, ya que el depósito fue retirado.

DD 20043218 expone una preparación proteolítica derivada de una cepa de *Nocardiopsis dassonvillei* ZIMET 43647, aunque sin información de secuencia. La cepa ya no se encuentra disponible.

JP 2003284571-A, publicada después de la primera fecha de solicitud de la presente invención, expone la secuencia de aminoácidos y la secuencia de ADN correspondiendo a una proteasa derivada de la especie *Nocardiopsis* TOA-1 (FERM P-18676). La secuencia ha sido introducida en GENESEQP con n° ADF43564.

Unas proteasas termoestables están descritas en la técnica anterior, por ejemplo una proteasa de *Termomonospora fusca* YX está descrita por Lao y Wilson en Appl. Environ. Microbiol. 62:4256-4259 (1996), y la secuencia fue depositada en las bases de datos públicas como sptrembl_086984. No obstante, esta proteasa no es homóloga de las proteasas de *Nocardiopsis*, ya que el porcentaje de identidad con las proteasas de la invención es inferior al 60%.

Mitsuiki Shinji *et al* (Bioscience Biotechnology and Biochemistry, vol. 66, no. 1, 2002, pp 164-167) revelan una proteasa alcalina no termoestable de la especie *Nocardiopsis* con una temperatura óptima de aproximadamente 70°C.

EP-A-0506448 expone una proteasa de enzimas Lisobacter y de algunos mutantes de los mismos que pueden ser termoestables, no obstante el ADN de codificación presenta menos del 72% de identidad con los nucleótidos 499-1062 de SEC ID N°:1 y los nucleótidos 502-1065 de SEC ID N°:11.

Un objeto de la presente invención es proporcionar proteasas termoestables que sean homólogas a las proteasas de *Nocardiopsis*, en particular con un potencial para su uso en alimentos para animales y/o detergentes.

Resumen de la invención

Varias proteasas termoestables fueron aisladas y caracterizadas, es decir una proteasa derivada de la especie *Nocardiopsis dassonvillei*, subespecie *dassonvillei* DSM 43235 (véase SEC ID N°: 1 y 2); una *Proteasa sintética* 22 (véase SEC ID N°: 7 y 8); una proteasa *L2a* derivada de la especie *Nocardiopsis* DSM 16424 (véase SEC ID N°s: 9 y 10); y *Proteasa* 8 derivada de *Nocardiopsis alba* DSM 15647 (véase SEC ID N°s: 11 y 12).

La invención expone un polipéptido aislado que posee una actividad proteasa, y que tiene una temperatura de fusión (T_m) de al menos 78°C, determinada por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) en un tampón de fosfato de sodio a 10 mM, cloruro de sodio a 50 mM, pH 7,0, usando un índice de barrido constante de 1,5°C/min, donde el polipéptido es seleccionado del grupo consistente en: (a) un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que posee un grado de identidad con los aminoácidos 1 a 188 de SEC ID N°: 2 y/o 1 a 188 de SEC ID N°: 12 de al menos 60%; (b) un polipéptido codificado por una secuencia de ácidos nucleicos que se hibridiza en condiciones de astringencia alta con cualquier nucleótido 499-1062 de SEC ID N°: 1 y/o 502-1065 de SEC ID N°: 11, y (c) un polipéptido que es codificado por una secuencia de ácidos nucleicos que tiene un grado de identidad para cualquiera de los nucleótidos 499-1062 de SEC ID N°: 1 y/o 502-1065 de SEC ID N°: 11 de al menos 72%. La invención también se refiere a secuencias de

ES 2 315 666 T3

ácido nucleico aisladas codificantes de tales proteasas; constructos de ácido nucleico, vectores, y a células huéspedes comprendiendo las secuencias de ácido nucleico; así como a métodos para producir y usar las proteasas, en particular en alimentos para animales.

- 5 También están descritos aquí:
- A. Un polipéptido aislado de la familia de peptidasas S2A y/o familia de peptidasas S1E que posee una actividad proteasa, y posee una secuencia amino comprendiendo al menos uno de los siguiente aminoácidos en la posición indicada: 10Y, 24S, 38T, 42G, 49T, 51T, 53Q, 54N, 82S, 86Q, 87S, 89T, 91T, 92S, 96A, 99A, 118N, 120T, 122R,
10 125Q, 129Y, 130S, 131L, 135N, 147F, 151S, 165S, 166V, 171Y, 179I, y/o 186I; preferiblemente 10Y, 38T, 82S, 99A, 118N, 120T, 122R, 125Q, 129Y, 130S, 131L, 165S, y/o 171Y; más preferiblemente junto con al menos uno de 95P, 100V, y/o 114I; y/o en conjunto con (H35 + D61 + S143); donde cada posición corresponde a una posición de SEC ID N°: 2;
- 15 B. El polipéptido de B que comprende al menos uno de los siguientes aminoácidos en la posición indicada: 38T, 92S, 120T, 125Q, 131L, 135N, 147F, 151S, 165S, y/o 171Y;
- C. El polipéptido de A que comprende al menos uno de los siguientes aminoácidos en la posición indicada: 10Y, 24S, 42G, 49T, 51T, 53Q, 54N, 82S, 86Q, 87S, 89T, 91T, 96A, 99A, 118N, 122R, 129Y, 130S, 166V, 179I, y/o 186I;
20
- D. Un polipéptido aislado de la familia de peptidasas S2A y/o familia de peptidasas S1E que posee una actividad proteasa, y posee una secuencia amino comprendiendo a al menos uno de los siguientes aminoácidos en la posición indicada: 25S, 38T, 42P, 44S, 49Q, 54R, 62S, 89S, 91S, 92S, 95A, 99Q, 100I, 114V, 120T, 125Q, 129Q, 131L, 135N, 147F, 151S, 165S, 166F, 171Y, 176N, 179L, 180S, 184L, y/o 185T; preferiblemente 25S, 38T, 42P, 44S, 54R, 62S,
25 125Q, 131L, 165S, 171Y, 176N, 179L, 180S, 184L, y/o 185T; más preferiblemente en conjunto con al menos uno de 24A, 51V, 53E, 86A, 87T, 96I, y/o 186L; y/o en conjunto con (H35 + D61 + S143); donde cada posición corresponde a una posición de SEC ID N°: 12.
- E. El polipéptido de D que comprende al menos uno de los siguientes aminoácidos en la posición indicada: 38T,
30 92S, 120T, 125Q, 131L, 135N, 147F, 151S, 165S, y/o 171Y.
- F. El polipéptido de D que comprende al menos uno de los siguientes aminoácidos en la posición indicada: 25S, 42P, 44S, 49Q, 54R, 62S, 89S, 91S, 95A, 99Q, 100I, 114V, 129Q, 166F, 176N, 179L, 180S, 184L, y/o 185T.
- 35 G. El polipéptido de cualquiera de A, B, C, D, E, y F que tiene una T_m de al menos 78°C medida por DSC en fosfato de sodio a 10 mM de, cloruro de sodio a 50 mM, pH 7,0; y/o una actividad relativa con pH9 y 80°C de al menos 0,40;
- H. El polipéptido de cualquiera de A, B, C, D, E, F, y G que tiene un porcentaje de identidad de al menos 60%
40 con cualquiera de los aminoácidos -166 a 188, preferiblemente 1-188, de SEC ID N°: 2; aminoácidos -192 a 196, preferiblemente 1-196, de SEC ID N°: 8; aminoácidos -195 a 189, preferiblemente 1-189 de SEC ID N°: 10; y/o con los aminoácidos -167 a -1, preferiblemente 1-188, de SEC ID N°: 12;
- I. El polipéptido de cualquiera de A, B, C, D, E, F, G; y H que es i) una proteasa bacteriana; ii) una proteasa del
45 *Filum Actinobacteria*; iii) de la clase *Actinobacteria*; iv) del orden *Actinomycetales* v) de la familia *Nocardiopsaceae*; vi) del género *Nocardiopsis*; y/o una proteasa derivada de vii) especies de *Nocardiopsis* como las *Nocardiopsis alkaphila*, *Nocardiopsis antarctica*, *Nocardiopsis prasina*, *Nocardiopsis cornpota*, *Nocardiopsis exhalans*, *Nocardiopsis halophila*, *Nocardiopsis halotolerans*, *Nocardiopsis kunsanensis*, *Nocardiopsis listed*, *Nocardiopsis lucentensis*, *Nocardiopsis metallicus*, *Nocardiopsis synnemataformans*, *Nocardiopsis trehalosi*, *Nocardiopsis tropica*, *Nocardiopsis umidischolae*, *Nocardiopsis xinjiangensis*, o *Nocardiopsis dassonvillei*, por ejemplo una proteasa derivada de *Nocardiopsis antarctica* o *Nocardiopsis dassonvillei*., por ejemplo, *Nocardiopsis dassonvillei* DSM 43235, especie *Nocardiopsis* DSM 16424, o *Nocardiopsis alba* DSM 15647, tal como un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de las partes de péptido maduro de cualquier SEC ID N°s: 2, 8, 10 ó 12;
- 50
- 55 J. Una secuencia de ácidos nucleicos aislada comprendiendo una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido de cualquiera de A, B, C, D, E, F, G, H o I;
- K. Un constructo de ácido nucleico comprendiendo la secuencia de ácidos nucleicos de J enlazada operativamente a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un huésped de expresión adecuado;
60
- L. Un vector de expresión recombinante comprendiendo el constructo de ácido nucleico de K;
- M. Una célula huésped recombinante comprendiendo el constructo de ácido nucleico de K o el vector de L;
- 65 N. Un método para la producción de un polipéptido de cualquiera de A, B, C, D, E, F, G, H, o I, el método comprendiendo: (a) el cultivo de una célula huésped recombinante de M para producir un sobrenadante comprendiendo el polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido;

ES 2 315 666 T3

O. Una planta transgénica, o parte de planta, capaz de expresar el polipéptido de cualquiera de A, B, C, D, E, F, G, H, o I;

5 P. Un animal transgénico, no humano, o productos, o elementos del mismo, capaces de expresar el polipéptido de cualquiera de los A, B, C, D, E, F, G, H, o I;

10 Q. Uso de al menos un polipéptido como definido en A, B, C, D, E, F, G, H o I (i) en alimentos para animales; (ii) en la preparación de una composición para su uso en alimentos para animales (iii) para mejorar el valor nutritivo de un alimento para animales; (iv) para aumentar la proteína digerible y/o soluble en las dietas para animales; (v) para aumentar el grado de hidrólisis de las proteínas en las dietas para animales; y/o (vi) para el tratamiento de proteínas;

15 R. Un aditivo de alimentos para animales comprendiendo al menos un polipéptido como definido en cualquiera de A, B, C, D, E, F, G, H o I; y (a) al menos una vitamina liposoluble, y/o (b) al menos una vitamina hidrosoluble, y/o (c) al menos un oligoelemento;

S. Una composición de alimentos para animales, preferiblemente una alimentos para peces, que posee un contenido de proteína bruta de 50 a 800 g/kg y comprendiendo al menos un polipéptido tal y como está definido en cualquiera de A, B, C, D, E, F, G, H, o I; o al menos un aditivo alimentario de R;

20 T. Una composición comprendiendo al menos un polipéptido tal y como está definido en cualquiera de las reivindicaciones A, B, C, D, E, F, G, H, o I, junto a al menos otra enzima seleccionada entre las alfa-amilasa (EC 3.2.1.1), fitasa (EC 3.1.3.8 o 3.1.3.26); xilanasa (EC 3.2.1.8); galactanasa (EC 3.2.1.89); alfa-galactosidasa (EC 3.2.1.22); proteasa (EC 3.4.-.-), fosfolipasa A1 (EC 3.1.1.32); fosfolipasa A2 (EC 3.1.1.4); lisofosfolipasa (EC 3.1.1.5); fosfolipasa C (3.1.4.3); fosfolipasa D (EC 3.1.4.4); y/o beta-glucanasa (EC 3.2.1.4 o EC 3.2.1.6); así como

25 U. Un uso en detergentes de al menos un polipéptido tal y como se ha definido en cualquiera de A, B, C, D, E, F, G, H o I.

También están descritos:

30 I. Un polipéptido aislado que posee una actividad proteasa, el cual, después de la incubación durante cuatro horas a 37°C y pH 6,5 ha degradado al menos un 36% (preferiblemente al menos 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, o al menos 81%) del inhibidor de soja Bowman-Birk, dicho porcentaje de degradación siendo determinado como 100% menos del porcentaje de intensidad de la banda inhibidora de Bowman-Birk intacta en un gel de SDS-PAGE (tris-glicina 4-20%) teñido después de la incubación, con respecto a la intensidad de la misma banda antes de la incubación, dichas intensidades de dichas bandas siendo determinadas por barrido de gel; donde el polipéptido es seleccionado del grupo consistente en: (a) un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que presenta un grado de identidad con los aminoácidos 1 a 188 de SEC ID N°: 2, 1 a 196 de SEC ID N°: 8, 1 a 189 de SEC ID N°: 10, y/o 1 a 188 de SEC ID N°: 12 de al menos el 60%; (b) un polipéptido que es codificado por una secuencia de ácidos nucleicos que se hibridiza en condiciones de astringencia baja con cualquiera de los nucleótidos 499-1062 de SEC ID N°: 1, 577-1164 de SEC ID N°: 7, 586-1152 de SEC ID N°: 9, y/o 502-1065 de SEC ID N°: 11; y (c) un polipéptido que es codificado por una secuencia de ácidos nucleicos que presenta un grado de identidad para cualquiera de los nucleótidos 499-1062 de SEC ID N°: 1, 577-1164 de SEC ID N°: 7, 586-1152 de SEC ID N°: 9, y/o 502-1065 de SEC ID N°: 11 de al menos el 60%;

45 II. Polipéptido de I, donde la incubación se desarrolla en un tampón de incubación comprendiendo ácido dimetilglutámico a 50 mM, NaCl a 150 mM, CaCl₂ a 1 mM, 0,01% de Tritón X-100, pH 6,5;

50 III. Polipéptido de cualquiera de I, o II, donde, durante la incubación, la relación entre el polipéptido proteasa y el inhibidor Bowman-Birk es 1:10, en base a A₂₈₀;

IV. El polipéptido de cualquiera de I II, o III, donde el gel es teñido con azul brillante Coomassie;

55 V. Polipéptido de cualquiera de I, II, III, o IV, donde el inhibidor Bowman-Birk es Sigma T-9777;

VI. Polipéptido de cualquiera de I II, III, IV, o V, también capaz de degradar al menos una de las siguientes proteínas de soja purificada: aglutinina de soja (SBA), el inhibidor de tripsina Kunitz, glicinina, y/o beta-conglicinina, usando los principios tal y como se han descrito en cualquiera de I, II, III, IV, o V;

60 VII. El polipéptido según la reivindicación VI que ha degradado al menos una de las proteínas de soja purificada hasta una extensión de al menos 10%, preferiblemente de al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 92%, 94%, 96%, o al menos 98%;

65 VIII. Una secuencia de ácidos nucleicos aislada comprendiendo una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido de cualquiera de I, II, III, IV, V, VI, o VII;

IX. Una secuencia de ácidos nucleicos aislada comprendiendo una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido que posee una actividad proteasa, polipéptido que, después de la incubación durante cuatro horas a 37°C y

ES 2 315 666 T3

pH 6,5, ha degradado al menos 36% (preferiblemente al menos 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, o al menos 81%) del inhibidor de soja Bowman-Birk, dicho porcentaje de degradación siendo determinado como 100% menos del porcentaje de intensidad de la banda inhibidora Bowman-Birk intacta en un gel de SDS-PAGE teñido (4-20% de Tris-glicina) después de la incubación, con respecto a la intensidad de la misma banda antes de la incubación, dichas intensidades de dichas bandas siendo determinadas por barrido del gel; donde la secuencia de ácidos nucleicos (a) se hibridiza en condiciones de astringencia baja con cualquiera de los nucleótidos 499-1062 de SEC ID N°: 1, 577-1164 de SEC ID N°: 7, 586-1152 de SEC ID N°: 9, y/o 502-1065 de SEC ID N°: 11; (b) tiene un grado de identidad con cualquiera de los nucleótidos 499-1062 de SEC ID N°: 1577 1164 de SEC ID N°: 7, 586-1152 de SEC ID N°: 9, y/o 502-1065 de SEC ID N°: 11 de al menos el 60%; y/o (c) codifica un polipéptido que tiene un grado de identidad con los aminoácidos 1 a 188 de SEC ID N°: 2, 1 a 196 de SEC ID N°: 8, 1 a 189 de SEC ID N°: 10, y/o 1 a 188 de SEC ID N°: 12 de al menos el 60%;

X. Un constructo de ácido nucleico comprende la secuencia de ácidos nucleicos de cualquiera de VIII, o IX, ligada operativamente a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un huésped de expresión adecuada;

XI. Un vector de expresión recombinante comprendiendo el constructo de ácido nucleico de X;

XII. Una célula huésped recombinante comprendiendo el constructo de ácido nucleico de X o el vector de XI;

XIII. Un método para la producción de un polipéptido de I, el método comprendiendo: (a) cultivo de una célula huésped recombinante de XII para producir un sobrenadante comprendiendo el polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido;

XIII. Una planta transgénica, o parte de planta, capaz de expresar el polipéptido de I;

XIV. Un animal transgénico, no humano, o productos, o elementos del mismo, capaces de expresar el polipéptido de I;

XV. Un método para la producción de un polipéptido de I, el método comprendiendo (a) el cultivo de cualquiera de las cepas siguientes: (i) *Nocardiosis dasonvillei*, subespecie *dasonvillei* DSM 43235, (ii) especie *Nocardiosis dasonvillei* DSM 16424, o (iii) *Nocardiosis alba* DSM 15647; y (b) recuperación del polipéptido;

XVI. Uso de al menos un polipéptido tal y como definido en I (i) en alimentos para animales; (ii) en la preparación de una composición para un uso en alimentos para animales; (iii) para mejorar el valor nutritivo de un alimento para animales; (iv) para aumentar la proteína digerible y/o soluble en las dietas de animales; (v) para aumentar el grado de hidrólisis de las proteínas en las dietas de animales; y/o (vi) para el tratamiento de las proteínas;

XVII. Un aditivo de alimento para animales comprendiendo al menos un polipéptido tal como se ha definido en I; y (a) al menos una vitamina liposoluble, y/o (b) al menos una vitamina hidrosoluble, y/o (c) al menos un oligoelemento;

XVIII. Una composición de alimento para animales que posee un contenido de proteína bruta de 50 a 800 g/kg y comprende al menos un polipéptido tal y como se ha definido en I, o al menos un aditivo alimentario de XVII;

XIX. Composición de producto alimentario de XVIII que es un producto alimentario para peces

XX. Una composición comprendiendo al menos un polipéptido tal como se ha definido en I, con al menos otra enzima seleccionada entre las alfa-amilasa (EC 3.2.1.1), fitasa (EC 3.1.3.8 o 3.1.3.26); xilanasas (EC 3.2.1.8); galactanasas (EC 3.2.1.89); alfa-galactosidasas (EC 3.2.1.22); proteasa (EC 3.4.-.-), fosfolipasa A1 (EC 3.1.1.32); fosfolipasa A2 (EC 3.1.1.4); lisofosfolipasa (EC 3.1.1.5); fosfolipasa C (3.1.4.3); fosfolipasa D (EC 3.1.4.4); y/o beta-glucanasa (EC 3.2.1.4 o EC 3.2.1.6); así como

XXI. Uso de al menos un polipéptido en detergentes tal como se ha definido en I.

También se describen aquí:

a. Un polipéptido aislado que posee una actividad proteasa, seleccionada del grupo consistente en: (a) un polipéptido que posee una secuencia de aminoácidos que presenta un grado de identidad (i) con los aminoácidos 1 a 188 de SEC ID N°: 2 de al menos el 85%, (ii) con los aminoácidos 1 a 196 de SEC ID N°: 8 de al menos el 85%, (iii) con los aminoácidos 1-189 de SEC ID N°: 10 de al menos el 85%, y/o un grado de identidad con los aminoácidos 1-188 de SEC ID N°: 12 de al menos el 89%; (b) un polipéptido que es codificado por una secuencia de ácidos nucleicos que se hibridiza en condiciones de astringencia media-alta con (i) los nucleótidos 499-1062 de SEC ID N°: 1, (ii) los nucleótidos 577-1164 de SEC ID N°: 7, (iii) los nucleótidos 586-1152 de SEC ID N°: 9, (iv) los nucleótidos 502-1065 de SEC ID N°: 11, (v) una subsecuencia de cualquiera (i)-(iv) de al menos 100 nucleótidos; y/o (vi) una cadena complementaria de cualquier (i)-(v); c) una variante del polipéptido que posee una secuencia de aminoácidos de (i) los aminoácidos 1 a 188 de SEC ID N°: 2, (II) aminoácidos 1 a 196 de SEC ID N°: 8, (iii) aminoácidos 1-189 de SEC ID N°: 10, o aminoácidos 1-188 de SEC ID N°: 12, comprendiendo una sustitución, delección, extensión, y/o inserción de

ES 2 315 666 T3

uno o más aminoácidos; (d) una variante alélica de (a), (b), o (c); y (e) un fragmento de (a), (b), (c), o (d) que posee una actividad proteasa;

b. Una secuencia de ácidos nucleicos aislada comprendiendo una secuencia de ácidos nucleicos que

(a) codifica el polipéptido de a; (b) codifica un polipéptido que posee una actividad proteasa, y que se hibridiza en condiciones de astringencia media-alta con (i) los nucleótidos 499-1062 de SEC ID N°: 1, (ii) los nucleótidos 577-1164 de SEC ID N°: 7, (iii) los nucleótidos 586-1152 de SEC ID N°: 9, (iv) los nucleótidos 502-1065 de SEC ID N°: 11, (v) una subsecuencia de cualquiera (i)-(iv) de al menos 100 nucleótidos; y/o (vi) una cadena complementaria de cualquier (i)-(v); y/o (c) codifica un polipéptido que posee una actividad proteasa y que tiene un grado de identidad (i) con los nucleótidos 499-1062 de SEC ID N°: 1 de al menos el 86%, (ii) con los nucleótidos 577-1164 de SEC ID N°: 7 de al menos el 65%, (iii) con los nucleótidos 586-1152 de SEC ID N°: 9 de al menos el 85%, (IV) con los nucleótidos 502-1065 de SEC ID N°: 11 de al menos el 89%;

c. Una secuencia de ácidos nucleicos aislada producida por (a) hibridación de un ADN en condiciones de astringencia media-alta con (i) los nucleótidos 499-1062 de SEC ID N°: 1, (ii) los nucleótidos 577-1164 de SEC ID N°: 7, (iii) los nucleótidos 586-1152 de SEC ID N°: 9, (iv) los nucleótidos 502-1065 de SEC ID N°: 11, (v) una subsecuencia de cualquiera (i)-(iv) de al menos 100 nucleótidos; y/o (vi) una cadena complementaria de cualquier (i)-(v); y (b) aislamiento de la secuencia de ácidos nucleicos;

d. Un constructo de ácido nucleico comprendiendo la secuencia de ácidos nucleicos de cualquier b, o c, enlazado operativamente con una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un huésped de expresión adecuada;

e. Un vector de expresión recombinante comprendiendo el constructo de ácido nucleico de d;

f. Una célula huésped recombinante comprendiendo el constructo de ácido nucleico de d o el vector de e;

g. Un método para la producción de a, el método comprendiendo: (a) cultivo de una célula huésped recombinante de f para producir un sobrenadante comprendiendo el polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido;

h. Una planta transgénica, o parte de planta, capaz de expresar el polipéptido de a;

i. Un animal transgénico, no humano, o productos, o elementos del mismo, capaces de expresar el polipéptido de a;

j. Un método para la producción de un polipéptido de a; el método comprendiendo (a) el cultivo de cualquiera de las cepas siguientes: (i) *Nocardiopsis dassonvillei*, subespecie *dassonvillei* DSM 43235, (ii) especie *Nocardiopsis* DSM 16424, o *Nocardiopsis alba* DSM 15647; y (b) recuperación del polipéptido;

k. Uso de al menos un polipéptido tal como se ha definido en a (i) en alimentos para animales; (ii) en la preparación de una composición para un uso en alimentos para animales (iii) para mejorar el valor nutritivo de un alimento para animales; (iv) para aumentar la proteína digerible y/o soluble en dietas de animales; (v) para aumentar el grado de hidrólisis de las proteínas en dietas de animales; y/o (vi) para el tratamiento de las proteínas;

l. Un aditivo de alimentos para animales comprendiendo al menos un polipéptido tal como se ha definido en a; y (a) al menos una vitamina liposoluble, y/o (b) al menos una vitamina hidrosoluble, y/o (c) al menos un oligoelemento;

m. Una composición de alimentos para animales que posee un contenido de proteína bruta de 50 a 800 g/kg y comprendiendo al menos un polipéptido tal como se ha definido en a, o al menos un aditivo alimentario de l;

n. Composición de producto alimentario de m que es un alimento para peces

o. Una composición comprendiendo al menos un polipéptido tal como se ha definido en a, con al menos otra enzima seleccionada entre las alfa-amilasa (EC 3.2.1.1), fitasa (EC 3.1.3.8 o 3.1.3.26); xilanasa (EC 3.2.1.8); galactanasa (EC 3.2.1.89); alfa-galactosidasa (EC 3.2.1.22); proteasa (EC 3.4.-.-), fosfolipasa A1 (EC 3.1.1.32); fosfolipasa A2 (EC 3.1.1.4); lisofosfolipasa (EC 3.1.1.5); fosfolipasa C (3.1.4.3); fosfolipasa D (EC 3.1.4.4); y/o beta-glucanasa (EC 3.2.1.4 o EC 3.2.1.6); así como

p. Uso de al menos un polipéptido en detergentes tal como se ha definido en a.

También se describe aquí: un polipéptido aislado que posee una actividad proteasa, seleccionada del grupo consistente en: (a) un polipéptido que posee una secuencia de aminoácidos que presenta un grado de identidad con los aminoácidos 1 a 188 de SEC ID N°: 2, 1 a 188 de SEC ID N°: 8, 1 a 196 de SEC ID N°: 8, y/o con de al menos el 84%; (b) un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que presenta un grado de identidad con los aminoácidos -166 a 188 de SEC ID N°: 2, y/o -192 a 196 de SEC ID N°: 8, de al menos el 75%; (c) un polipéptido que es codificado por una secuencia de ácidos nucleicos que se hibridiza en condiciones de astringencia media-alta con (i) el ADN de codificación de una proteasa obtenible a partir del ADN genómico de *Nocardiopsis dassonvillei*, subespecie

ES 2 315 666 T3

dassonvillei DSM 43235 mediante el uso de iniciadores SEC ID N°s: 3 y 4. (ii) nucleótidos 499-1062 de SEC ID N°: 1, y/o 577-1164 de SEC ID N°: 7; (iii) nucleótidos 1-1062 de SEC ID N°: 1, y/o 1-1164 de SEC ID N°: 7; (iv) una subsecuencia de (i) o (ii) o (iii) de al menos 100 nucleótidos; y/o (v) una cadena complementaria de (i), (ii), (iii) o (iv); (d) una variante del polipéptido con una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 1 a 188, o -166 a 188 de SEC ID N°: 2, o aminoácidos 1 a 196, o -192 a 196 de SEC ID N°: 8, comprendiendo una sustitución, delección, extensión, y/o inserción de uno o más aminoácidos; (e) una variante alélica de (a), (b) o (c); y (f) un fragmento de (a), (b), (c), (d) o (e) que posee una actividad proteasa;

Un polipéptido aislado que posee una actividad proteasa, y que presenta una temperatura de fusión (T_m) de al menos 78°C, determinada por calorimetría diferencial de barrido (DSC) en un tampón de fosfato de sodio a 10 mM, de cloruro de sodio a 50 mM, pH 7,0, usando un índice de barrido constante de 1,5°C/min, donde el polipéptido es seleccionado del grupo consistente en: (a) un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que presenta un grado de identidad con los aminoácidos 1 a 188 de SEC ID N°: 2, 1 a 188 de SEC ID N°: 8, y/o 1 a 196 de SEC ID N°: 8, de al menos el 50%; (b) un polipéptido que posee una secuencia de aminoácidos que presenta un grado de identidad con los aminoácidos -166 a 188 de SEC ID N°: 2, y/o -192 a 196 de SEC ID N°: 8, de al menos el 50%; (c) un polipéptido que es codificado por una secuencia de ácidos nucleicos que se hibridiza en condiciones de astringencia baja con el ADN de codificación de una proteasa obtenible a partir del ADN genómico de *Nocardiaopsis dassonvillei*, subespecie *dassonvillei* DSM 43235 mediante el uso de iniciadores de SEC ID N°: 3 y 4; nucleótidos 499-1062 de SEC ID N°: 1, y/o 577 1164 de SEC ID N°: 7; nucleótidos 1-1062 de SEC ID N°: 1, y/o 1-1164 de SEC ID N°: 7; una subsecuencia de (i) o (ii) o (iii) de al menos 100 nucleótidos; y/o una cadena complementaria de (i), (ii), (iii) o (iv); (d) una variante del polipéptido con una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 1 a 188, o -166 a 188 de SEC ID N°: 2, o aminoácidos 1 a 196, o -192 a 196 de SEC ID N°: 8, comprendiendo una sustitución, delección, extensión, y/o inserción de uno o más aminoácidos; (e) una variante alélica de (a), (b) o (c); y (f) un fragmento de (a), (b), (c), (d) o (e) que posee una actividad proteasa;

Una secuencia de ácidos nucleicos aislada comprendiendo una secuencia de ácidos nucleicos que (a) codifica el polipéptido de la reivindicación 1; (b) codifica un polipéptido que posee una actividad proteasa, y se hibridiza en condiciones de astringencia media-alta con (i) el ADN de codificación de una proteasa obtenible a partir del ADN genómico de *Nocardiaopsis dassonvillei*, subespecie *dassonvillei* DSM 43235 mediante el uso de iniciadores SEC ID N°s. 3 y 4; (ii) nucleótidos 499-1062 o 1-1062 de SEC ID N°: 1, y/o 577-1164 o 1-1164 de SEC ID N°: 7; (iii) una subsecuencia de (i) o (ii) de al menos 100 nucleótidos; y/o (iv) una cadena complementaria de (i), (ii), o (iii); (c) codifica un polipéptido que posee una actividad proteasa y que presenta un grado de identidad con los nucleótidos 499-1062 SEC ID N°: 1, y/o 577-1164 de SEC ID N°: 7, de al menos el 85%; y/o (d) codifica un polipéptido que posee una actividad proteasa y que presenta un grado de identidad con los nucleótidos 1-1062 SEC ID N°: 1, y/o nucleótidos 1-1164 de SEC ID N°: 7 de al menos el 81%;

Una secuencia de ácidos nucleicos aislada comprendiendo una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido que posee una actividad proteasa y una temperatura de fusión (T_m) de al menos 78°C, determinada por calorimetría diferencial de barrido (DSC) en un tampón de 10 mM de fosfato sódico, 50 mM de cloruro sódico, pH 7,0, usando un índice de barrido constante de 1,5°C/min, donde la secuencia de ácidos nucleicos (a) codifica el polipéptido susodicho; (b) se hibridiza en condiciones de astringencia baja con el ADN codificante de una proteasa obtenible a partir del ADN genómico de *Nocardiaopsis dassonvillei*, subespecie *dassonvillei* DSM 43235 mediante el uso de iniciadores SEC ID NO: 3 y 4; nucleótidos 499-1062 o 1-1062 de SEC ID N°: 1, y/o 577-1164 o 1-1164 de SEC ID N°: 7; una subsecuencia de (i) o (ii) de al menos 100 nucleótidos; y/o una cadena complementaria de (i), (ii), o (iii); (c) presenta un grado de identidad con los nucleótidos 499-1062 de SEC ID N°: 1, y/o 577 1164 de SEC ID N°: 7, de al menos el 50%; y/o (d) presenta un grado de identidad con los nucleótidos 1-1062 de SEC ID N°: 1, y/o 1-1164 de SEC ID N°: 7, de al menos el 50%;

Una secuencia de ácidos nucleicos aislada producida por (a) hibridación de un ADN en condiciones de astringencia media-alta con el ADN de codificación de una proteasa obtenible a partir del ADN genómico de *Nocardiaopsis dassonvillei*, subespecie *dassonvillei* DSM 43235 mediante el uso de cebadores SEC ID N°: 3 y 4; nucleótidos 499-1062 o 1-1062 de SEC ID N°: 1, y/o 577-1164 o 1-1164 de SEC ID N°: 7; una subsecuencia de (i) o (ii) de al menos 100 nucleótidos; o una cadena complementaria de (i), (ii) o (iii); y (b) aislamiento de la secuencia de ácidos nucleicos;

Un constructo de ácido nucleico comprendiendo la secuencia de ácidos nucleicos anterior enlazada operativamente con una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un huésped de expresión adecuado;

Un vector de expresión recombinante comprendiendo el constructo de ácido nucleico;

Una célula huésped recombinante comprendiendo el constructo de ácido nucleico o el vector;

Un método para la producción del polipéptido anterior, el método comprendiendo: (a) el cultivo de una célula huésped recombinante según la reivindicación 8 para producir un sobrenadante comprendiendo el polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido;

Una planta transgénica, o parte de planta, capaz de expresar el polipéptido anterior;

ES 2 315 666 T3

Un animal transgénico, no humano, o productos, o elementos del mismos, capaces de expresar el polipéptido anterior;

5 Uso de al menos uno de los polipéptidos anteriores (i) en alimentos para animales; (ii) en la preparación de una composición para un uso en alimentos para animales (iii) para mejorar el valor nutritivo de un alimento para animales; (iv) para aumentar la proteína digerible y/o soluble en dietas de animales; (v) para aumentar el grado de hidrólisis de las proteínas en dietas de animales; y/o (vi) para el tratamiento de las proteínas;

10 Un aditivo de alimentos para animales comprendiendo al menos un polipéptido tal como se ha definido anteriormente; y (a) al menos una vitamina soluble en grasa, y/o (b) al menos una vitamina soluble en agua, y/o (c) al menos un oligoelemento;

15 Una composición de alimentos para animales que posee un contenido de proteína bruta de 50 a 800 g/kg y comprendiendo al menos un polipéptido tal y como se ha definido anteriormente, o al menos un aditivo alimentario; [0031]
Una composición comprendiendo al menos un polipéptido tal y como se ha definido anteriormente, con al menos otra enzima seleccionada entre alfa-amilasa (EC 3.2.1.1), fitasa (EC 3.1.3.8 o 3.1.3.26); xilanasas (EC 3.2.1.8); galactanasas (EC 3.2.1.89); alfa-galactosidasas (EC 3.2.1.22); proteasa (EC 3.4.-.-), fosfolipasa A1 (EC 3.1.1.32); fosfolipasa A2 (EC 3.1.1.4); lisofosfolipasa (EC 3.1.1.5); fosfolipasa C (3.1.4.3); fosfolipasa D (EC 3.1.4.4); y/o beta-glucanasas (EC 3.2.1.4 o EC 3.2.1.6);

20 Uso en detergentes de al menos un polipéptido tal y como se ha definido anteriormente;

25 Un polipéptido aislado de la familia de peptidasa S2A y/o familia de peptidasa S1E que posee una actividad proteasa, y con una secuencia amino comprendiendo al menos uno de los siguientes aminoácidos en la posición indicada: 10Y, 24S, 38T, 42G, 49T, 51T, 53Q, 54N, 82S, 86Q, 87S, 89T, 91T, 92S, 96A, 99A, 118N, 120T, 122R, 125Q, 129Y, 130S, 131 L, 135N, 147F, 151 S, 165S, 166V, 171 Y, 1791, y/o 1861; preferiblemente 10Y, 38T, 82S, 95P, 99A, 100V, 1141, 118N, 120T, 122R, 125Q, 129Y, 130S, 131 L, 165S, y/o 171Y; más preferiblemente con al menos uno de 95P, 100V, y/o 1141; y/o junto con (H35 + D61 + S143); donde cada posición corresponde a una posición de SEC ID N°: 2;

30 La familia de polipéptidos S2A o S1E anteriores comprendiendo al menos uno de los siguientes aminoácidos en la posición indicada: 38T, 92S, 120T, 125Q, 131L, 135N, 147F, 151S, 165S, y/o 171Y;

35 La familia de polipéptidos S2A o S1E anteriores comprendiendo al menos uno de los siguiente aminoácidos en la posición indicada: 10Y, 24S, 42G, 49T, 51T, 53Q, 54N, 82S, 86Q, 87S, 89T, 91T, 96A, 99A, 118N, 122R, 129Y, 130S, 166V, 1791, y/o 1861;

40 La familia de polipéptidos S2A o S1E anteriores que posee una T_m de al menos 78°C medida por DSC en fosfato de sodio a 10 mM, cloruro de sodio a 50 mM, pH 7,0; y/o una actividad relativa en pH9 y a 80°C de al menos 0,40;

La familia de polipéptidos S2A o S1E anteriores con un porcentaje de identidad con los aminoácidos 1-188, o -166 a 188, de SEC ID N°: 2, y/o con los aminoácidos 1-196, o -192 a 196, de SEC ID N°: 8, de al menos el 50%;

45 La familia de polipéptidos S2A o S1E anteriores que es i) una proteasa bacteriana; ii) una proteasa del *Filum Actinobacteria*; iii) de la clase *Actinobacteria*; iv) del orden de *Actinometales* de v) de la familia *Nocardiopsaceae*; vi) del género *Nocardiopsis*; y/o una proteasa derivada de vii) especies de *Nocardiopsis* tales como *Nocardiopsis alba*, *Nocardiopsis antarctica*, *Nocardiopsis prasina*, *Nocardiopsis cornposta*, *Nocardiopsis exhalans*, *Nocardiopsis halophila*, *Nocardiopsis halotolerans*, *Nocardiopsis kunsanensis*, *Nocardiopsis listeri*, *Nocardiopsis lucentensis*, *Nocardiopsis metallicus*, *Nocardiopsis synnemataformans*, *Nocardiopsis trehalosi*, *Nocardiopsis tropica*, *Nocardiopsis umidischolae*, *Nocardiopsis xinjiangensis*, o *Nocardiopsis dassonvillei*, por ejemplo una proteasa derivada de *Nocardiopsis antarctica* o *Nocardiopsis dassonvillei*, por ejemplo *Nocardiopsis dassonvillei* DSM 43235, tal como un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de aminoácidos 1 a 188, o -166 a 188, de SEC ID N°: 2;

55 Una secuencia de ácidos nucleicos aislada comprendiendo una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la familia de polipéptidos S2A o S1E anteriores;

Un constructo de ácidos nucleicos comprendiendo la secuencia de ácidos nucleicos enlazada operativamente con una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un huésped de expresión adecuado;

60 Un vector de expresión recombinante comprendiendo el constructo de ácido nucleico;

Una célula huésped recombinante comprendiendo el constructo de ácido nucleico o el vector;

65 Un método para la producción de la familia de polipéptidos S2A o S1E anteriores, el método comprendiendo: (a) cultivo de una célula huésped recombinante para producir un sobrenadante comprendiendo el polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido;

Una planta transgénica, o parte de planta, capaz de expresar la familia de polipéptidos S2A o Si E anteriores.

ES 2 315 666 T3

Un animal transgénico, no humano, o productos, o elementos del mismo, capaces de expresar el polipéptido anterior de la familia S2A o S1E.

5 Uso de al menos uno de los polipéptidos anteriores S2A o S1E (i) en alimentos para animales (ii) en la preparación de una composición para un uso en alimentos para animales (iii) para mejorar el valor nutritivo de un alimento para animales; (iv) para aumentar la proteína digerible y/o soluble en dietas de animales; (v) para aumentar el grado de hidrólisis de proteínas en dietas de animales; y/o (vi) para el tratamiento de las proteínas;

10 Un aditivo de alimento para animales comprendiendo al menos uno de los polipéptidos anteriores S2A o S1E; y (a) al menos una vitamina liposoluble, y/o (b) al menos una vitamina hidrosoluble, y/o (c) al menos un oligoelemento;

Una composición de alimentos para animales que posee un contenido de proteína bruta de 50 a 800 g/kg y comprendiendo al menos uno de los polipéptidos anteriores S2A o S1E, o al menos un aditivo alimentario anterior;

15 Una composición comprendiendo al menos uno de los polipéptidos anteriores S2A o S1E, con al menos otra enzima seleccionada entre las alfa-amilasa (EC 3.2.1.1), fitasa (EC 3.1.3.8 o 3.1.3.26); xilanasa (EC 3.2.1.8); galactanasa (EC 3.2.1.89); alfa-galactosidasa (EC 3.2.1.22); proteasa (EC 3.4.-.-), fosfolipasa A1 (EC 3.1.1.32); fosfolipasa A2 (EC 3.1.1.4); lisofosfolipasa (EC 3.1.1.5); fosfolipasa C (3.1.4.3); fosfolipasa D (EC 3.1.4.4); y/o beta-glucanasa (EC 3.2.1.4 o EC 3.2.1.6); así como

20

Uso de al menos uno de los polipéptidos anteriores S2A o S1E en detergentes.

Los segundo, tercero, cuarto, y quinto aspectos anteriores, son, independientemente los unos de los otros, también subaspectos preferidos del primer aspecto de la invención, así como subaspectos preferidos de cada uno.

25

Descripción detallada de la invención

30 Los polipéptidos que poseen una actividad proteasa, o las proteasas, son designados también a veces peptidasas, proteinasas, hidrolasas peptídicos, o enzimas proteolíticas. Las proteasas pueden ser del tipo exo que hidroliza péptidos empezando en cada extremo de las mismas, o del tipo endo que actúa internamente en cadenas polipéptidas (endopeptidasas). Las endopeptidasas muestran una actividad en los sustratos peptídicos bloqueados terminalmente en N y C que son importantes para la especificidad de la proteasa en cuestión.

35 El término "proteasa" es definido aquí como una enzima que hidroliza enlaces peptídicos. Incluye cualquier enzima del grupo de enzimas EC 3.4 (incluyendo cada una de las trece subclases del mismo). El número EC se refiere a la Nomenclatura Enzimática de 1992 de NC-IUBMB, Academic Press, San Diego, California, incluyendo los suplementos 1-5 publicados en Eur. J. Biochem. 1994: 223: 1-5; Eur. J. Biochem. 1995: 232: 1-6; Eur. J. Biochem. 1996: 237: 1-5; Eur. J. Biochem. 1997: 250: 1-6; y Eur. J. Biochem. 1999, 264, 610-650; respectivamente. La nomenclatura es complementada y actualizada regularmente; véase por ejemplo la red informática mundial (WWW) en <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/index.html>.

40

45 Las proteasas son clasificadas en base a su mecanismo catalítico en los grupos siguientes: Serina proteasas (S), Cisteína proteasas (C), proteasas aspárticas (A), Metalo proteasas (M), y proteasas desconocidas, o aún sin clasificar, (U), véase Handbook of Proteolytic Enzymes, A.J. Barrett, N.D. Rawlings, J.F. Woessner (eds), Academic Press (1998), en particular la parte de introducción general.

En formas de realización particulares, las proteasas de la invención y para un uso según la invención, son seleccionadas del grupo consistente en:

50

(a) Proteasas pertenecientes al grupo enzimático EC 3.4.-.-;

(b) Serina proteasas pertenecientes al grupo S del manual precedente;

55

(c) Serina proteasas de la familia de peptidasa S2A; y/o

(d) Serina proteasas de la familia de peptidasa S1E tal y como está descrito en Biochem. J. 290:205-218 (1993) y en la base de datos de proteasas MEROPS, publicación 6.20, 24 de Marzo de 2003, (www.merops.ac.uk). La base de datos está descrita en Rawlings, N.D., O'Brien, E. A. & Barrett, A.J. (2002) MEROPS: Base de datos de proteasas. Nucleic Acids Res. 30: 343-346.

60

65 Para determinar si una proteasa proporcionada es una Serina proteasa, y una proteasa de la familia S2A, se hace referencia al manual anterior y a los principios indicados en éste. Tal determinación puede efectuarse para todos los tipos de proteasas, ocurriendo de forma natural o proteasas de tipo salvaje; o creadas genéticamente o proteasas sintéticas.

Una actividad proteasa puede ser medida usando cualquier ensayo, en el que se emplee un sustrato, incluyendo enlaces peptídicos importantes para la especificidad de la proteasa en cuestión. También se tienen que adaptar el pH

ES 2 315 666 T3

de ensayo y la temperatura de ensayo a la proteasa en cuestión. Ejemplos de valores de pH de ensayo son pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, ó 12. Ejemplos de temperaturas de ensayo son 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 90, ó 95°C.

5 Ejemplos de sustratos de proteasa son caseína, tal como la Caseína entrecruzada con azurina (caseína AZCL). Dos ensayos de proteasa están descritos en el Ejemplo 2 de la presente, se puede usar cualquiera de éstos para determinar una actividad proteasa. Para los objetivos de esta invención, el llamado ensayo pNA es un ensayo preferido.

10 No hay ninguna limitación respecto al origen de la proteasa de la invención y/o para su uso según la invención. De esta manera, el término proteasa incluye no sólo proteasas naturales o de tipo salvaje obtenidas a partir de microorganismos de cualquier género, sino también cualquier mutante, variante, fragmento, etc. de los mismos exponiendo una actividad proteasa, así como proteasas sintéticas, tales como proteasas redistribuidas, y proteasas de consenso. Tales proteasas creadas genéticamente pueden ser preparadas según la técnica conocida, por ejemplo por mutagénesis dirigida, por PCR (mediante el uso de un fragmento de PCR conteniendo la mutación deseada como uno de los iniciadores en las reacciones de PCR), o por Mutagénesis Aleatoria. La preparación de las proteasas de consenso está descrita por ejemplo en EP 897985. La transposición de genes por ejemplo está descrita en general en WO 95/22625 y WO 96/00343. La recombinación de los genes de proteasa pueden realizarse de manera independiente con respecto a la secuencia específica de los progenitores mediante redistribución sintética como está descrito en Ness, J.E. *et al*, en Nature Biotechnology, Vol. 20 (12), páginas. 1251-1255, 2002. Los oligonucleótidos sintéticos degenerados en su secuencia de ADN para proporcionar la posibilidad de encontrar todos los aminoácidos en el grupo de proteasas progenitoras son diseñados y los genes son ensamblados según la referencia. La recuperación puede ser realizada para toda la secuencia en su longitud o sólo para una parte de la secuencia y ser combinada más tarde con el resto del gen para formar una secuencia de longitud total. Las proteasas de las partes de péptido maduro de SEC ID N°: 2, 8, 10 y 12, tal como la Proteasa 22 (SEC ID N°: 8), y la proteasa derivada de *Nocardiopsis dassonvillei*, subespecie *dassonvillei* DSM 43235 (SEC ID N°: 2), son ejemplos particulares de tales proteasas progenitoras que pueden ser sometidas a una recuperación como se ha descrito anteriormente, si se desea en conjunto con la proteasa derivada de la especie *Nocardiopsis* NRRL 18262, para proporcionar proteasas adicionales de la invención. Los términos “obtenido a partir de” como se utiliza en este caso en relación a una fuente determinada significará que el polipéptido codificado por la secuencia de ácidos nucleicos es producido por la fuente o por una célula donde la secuencia de ácidos nucleicos de la fuente está presente. En una forma de realización preferida, el polipéptido es segregado extracelularmente.

30 En una forma de realización específica, la proteasa es una variante hipoalérgica, diseñada para inducir una respuesta inmunológica reducida cuando es expuesta en animales, incluyendo el hombre. Los términos respuesta inmunológica deben ser entendidos como cualquier reacción del sistema inmunitario de un animal expuesto a la proteasa. Un tipo de respuesta inmunológica es una respuesta alérgica que conduce a niveles en aumento de IgE en el animal expuesto. Se pueden preparar variantes hipoalérgicas por medio de técnicas conocidas en el arte. Por ejemplo la proteasa puede ser conjugada con porciones o epítomos de recubrimiento de fracciones polímeras de la proteasa implicadas en una respuesta inmunológica. La conjugación con polímeros pueden implicar un acoplamiento químico *in vitro* del polímero con la proteasa, por ejemplo tal y como está descrito en WO 96/17929, WO 98/30682, WO 98/35026, y/o WO 99/00489. La conjugación puede además o de forma alternativa con respecto a ésta, implicar un acoplamiento en vivo de polímeros con la proteasa. Tal conjugación puede ser obtenida por ingeniería genética de la secuencia de nucleótidos de codificación de la proteasa, por inserción de unas secuencias de consenso de codificación de otros sitios de glicosilación en la proteasa y por expresión de la proteasa en un huésped capaz de glicosilar la proteasa, véase por ejemplo WO 00/26354. Otra forma de proveer variantes hipoalérgicas es la ingeniería genética de la secuencia de nucleótidos de codificación de la proteasa en una forma tal que la proteasa se auto-oligomeric, teniendo como efecto el hecho de que los monómeros de las proteasas pueden proteger los epítomos de otros monómeros de proteasas y reducir así la antigenicidad de los oligómeros. Tales productos y su preparación están descritos por ejemplo en WO 96/16177. Los epítomos implicados en una respuesta inmunológica pueden ser identificados por varios métodos como el método de exposición en fagos descrito en WO 00/26230 y WO 01/83559, o el procedimiento aleatorio descrito en EP 561907. Una vez que se ha identificado un epítomo, su secuencia de aminoácidos puede ser alterada para producir propiedades inmunológicas alteradas de la proteasa mediante técnicas de manipulación de genes conocidas, como una mutagénesis dirigida en el sitio (véase por ejemplo WO 00/26230, WO 00/26354 y/o WO 00/22103) y/o la conjugación de un polímero puede ser realizada a una proximidad suficiente del epítomo para la protección del epítomo por el polímero.

55 Un polipéptido, según otro aspecto de la presente invención, está definido en la reivindicación 1 y puede comprender una secuencia de aminoácidos que presente un grado de identidad con la parte de péptido maduro de cualquiera de las SEC ID N°: 2, 8, 10, ó 12, por ejemplo aminoácidos de 1 a 188 de SEC ID N°: 2, y/o con los aminoácidos 1 a 196 de SEC ID N°: 8 (las partes de péptido maduro), de por ejemplo al menos aproximadamente el 60%, y con una actividad proteasa (más adelante “polipéptidos homólogos”). En formas de realización particulares, el grado de identidad con cualquiera de las partes de péptido maduro de cualquiera de las SEC ID N°: 2, 8, 10 ó 12 es aproximadamente de al menos 62%, 64%, 66%, 68%, 70%, 72%, 74%, 76%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o de al menos 99%.

65 Para los objetivos de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos, así como el grado de identidad entre dos secuencias de nucleótidos, es determinado por el programa “alineación” que es una alineación Needleman-Wunsch (es decir una alineación global). El programa es usado para una alineación de polipéptidos, así como de secuencias de nucleótidos. La matriz de marcado por defecto BLOSUM50 es usada para la alineación de polipéptidos, y la matriz de identidad por defecto es usada para la alineación de nucleótidos. La penalización para el

ES 2 315 666 T3

primer residuo de un espacio es de -12 para los polipéptidos y de -16 para los nucleótidos. Las penalizaciones para otros residuos son de -2 para los polipéptidos, y de -4 para los nucleótidos.

La "alineación" forma parte del paquete FASTA versión v20u6 (véase W. R. Pearson y D. J. Lipman (1988), "Improved Tools for Biological Sequence Analysis", PNAS 85:2444-2448, y W. R. Pearson (1990) "Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA," Methods in Enzymology 183:63-98). Las alineaciones de proteínas FASTA usan el algoritmo Smith-Waterman sin limitación en su tamaño de espacio (véase "Smith-Waterman algorithm", T. F. Smith y M. S. Waterman (1981) J. Mol. Biol. 147:195-197). [0064] En una forma de realización particular, las partes de péptido maduro, o partes de péptido maduro previstas o deseadas, de las dos secuencias de aminoácidos son usadas para la alineación. En una alternativa, esta parte de la secuencia, cuya identidad de parte de péptido maduro de las SEC ID N°: 2 y/o SEC ID N°: 8 es examinada, es elegida, la cual, según una alineación múltiple realizada tal como se describe más abajo es más similar a la parte de péptido maduro de SEC ID N°: 2 y/o 8, es decir a los residuos aminoácidos correspondientes identificados por la alineación múltiple.

En el presente contexto, la base para la numeración de los residuos aminoácidos o asignación de números de posición, en referencia al segundo aspecto de la invención, es la SEC ID N°: 2 empezando por A1 y terminando por T188. Como alternativa, la base consiste en aminoácidos 1-188 de la proteasa derivada de la especie *Nocardia* NRRL 18262 (SEC ID N°: 1 tal como está descrita en WO 01/58276, preferiblemente SEC ID N°: 1 tal como está descrita en WO 01/58276 donde A87 es sustituido por T87. Las proteasas pueden comprender extensiones en comparación con estas secuencias de referencia, por ejemplo SEC ID N°: 2, es decir en el N-terminal, y/o los extremos C-terminal de éstas. Los aminoácidos de tales extensiones, si están presentes, deben ser numerados como se hace normalmente en la técnica, es decir para una extensión de C-terminal: 189, 190, 191 y sucesivamente, y para una extensión de N-terminal -1, -2, -3 y sucesivamente.

Para cada residuo de aminoácidos en cada proteasa alineada con la secuencia de referencia, por ejemplo las SEC ID N°: 2, como se ha explicado anteriormente (para los objetivos de determinación del grado de identidad), es posible asignar directamente y sin ambigüedad un residuo de aminoácidos en la secuencia de referencia a la que corresponde, por ejemplo, SEC ID N°: 2. Los residuos correspondientes tienen la misma posición, o número asignados, en referencia, por ejemplo, a SEC ID N°: 2.

Para cada residuo de aminoácidos en otra proteasa, la posición correspondiente de la secuencia de referencia, por ejemplo la SEC ID N°: 2, puede ser definida de la manera siguiente:

La secuencia de aminoácidos de la otra proteasa es designada SEQ X. Una posición correspondiente a la posición N de SEC ID N°: 2 puede ser definida de la manera siguiente: la SEC X es alineada con la SEC ID N°: 2 como se ha especificado más arriba. A partir de la alineación, la posición en la secuencia SEC X correspondiendo a la posición N de SEC ID N°: 2 puede ser derivada claramente y sin ambigüedad, mediante el uso de los principios descritos más abajo.

La SEC X puede ser una parte madura de la proteasa en cuestión, o puede incluir también una parte de péptido señal, o puede ser un fragmento de la proteasa madura que posee una actividad proteasa, por ejemplo un fragmento de la misma longitud que la SEC ID N°: 2, y/o puede ser el fragmento que se extiende desde A1 hasta T188 cuando se alinea con la SEC ID N°: 2 tal y como está descrito en este caso.

Tres alineaciones son insertadas más abajo como Tablas I, II y III. Las alineaciones fueron preparadas tal y como se ha descrito anteriormente, mediante la alineación de la parte madura de otra proteasa (SEC X, SEC X2, y SEC X3, respectivamente) con la SEC ID N°: 2. Se muestran aproximadamente 50 residuos de aminoácidos de cada proteasa.

Si se observa primero la alineación de la Tabla 1, es evidente, por ejemplo, que el G42 de SEC ID N°: 2 corresponde al P42 de SEC X, ya que estos residuos se sitúan en la extremidad superior el uno con respecto al otro en la alineación. Estos llevan ambos el número asignado 42, es decir, el número del residuo correspondiente en la SEC ID N°: 2. Resulta evidente, también a partir de esta alineación, por ejemplo, que la SEC X no comprende 10Y sino 38T.

TABLA I

	ADIIGGLAYY	MGGRCSVGFA	ATNSAGQPGF	VTAGHCCTVG	TGVTIGNGTG	SEC ID N°: 2
	ADIIGGLAYT	MGGRCSVGFA	ATNSAGQPGF	VTAGHCCTVG	TPVSIGNGQG	SEC X1
10	20	30	40	50		

Las Tablas II y III son ejemplos de los espacios que se producen por las alineaciones en cualquiera de las dos secuencias.

En la alineación de la Tabla II, un espacio está formado en la SEC X2. El residuo de aminoácidos destacado P de la SEC X2 es, para los objetivos de la presente, designado P28, aunque en SEC X es P25 como tal.

ES 2 315 666 T3

TABLA II

5	ADIIGGLAYY	MGGRCSVGFA	ATNSAGQPGF	VTAGHCGTVG	TGVTIGNGTG	SEC ID N°: 2
	ADIIGGLAYT	MGGRCSVGFA	ATNA ___ PGF	VTAGHCGTVG	TPVSIINGQG	SEC X2
	10	20	30	40	50	

10 En la alineación de la Tabla III, un espacio está formado en la SEC ID N°: 2. Cuando un espacio está formado entre los aminoácidos que poseen un número de posición nn y (nn+1) de SEC ID N°: 2, a cada posición del espacio se le asigna un caso inferior o letra de subíndice: a, b, c, etc. al número de posición anterior, es decir nn. De esta manera, cada posición del espacio lleva el número nna, nnb etc. El residuo de aminoácidos destacado R de de la SEC X3, para los objetivos de la presente, es designado R33a, aunque en la SEC X3 se designa R34 como tal.

15 TABLA III

20	ADIIGGLAYY	MGGRCSVGFA	ATNSAGQPGF	VTA-GHC GT	VGTVTIGNGTG	SEC ID N°: 2
	ADIIGGLAYT	MGGRCSVGFA	ATNASGQPGF	VTARSGHCGT	VGTPVSIINGQG	SEC X3
	10	20	30	40	50	

25 En otras formas de realización particulares de cada aspecto de la invención, el polipéptido de la invención tiene una temperatura de fusión (T_m) de al menos 78°C, 79°C, 80°C, 81°C, 82°C, 83°C, 84°C, 85°C, 86°C, 87°C, 88°C, 89°C, 90°C, 91°C, 92°C, 93°C, 94°C, o de al menos 95°C, determinada por calorimetría diferencial de barrido (DSC).

30 La calorimetría por análisis diferencial se realiza en un tampón de fosfato de sodio a 10 mM, cloruro de sodio a 50 mM, pH 7,0.

El índice de barrido es constante, por ejemplo de 1,5°C/min.

El intervalo de barrido puede ser de 20 a 100°C.

35 No existen limitaciones superiores en la T_m , no obstante, se considera actualmente que la T_m puede ser inferior a 150°C, 145°C, 140°C, 135°C, 130°C, 125°C, 120°C, 115°C, 110°C, 105°C, o inferior a 100°C.

40 En una forma de realización alternativa, otro tampón es seleccionado para el barrido, por ejemplo un tampón de pH 5,0, 5,5, 6,0, o pH 6,5.

En otras formas de realización alternativas, se puede utilizar un índice de barrido superior o inferior, por ejemplo uno inferior de 1,4°C/min, 1,3°C/min, 1,2°C/min, 1,1°C/min, 1,0°C/min, o 0,9°C/min.

45 Se hace referencia al Ejemplo 2 para más detalles acerca del procedimiento de barrido.

En una forma de realización particular, la proteasa de la invención muestra un perfil de actividad de temperatura corregida en comparación con la proteasa derivada de la especie *Nocardioopsis* NRRL 18262. Por ejemplo, la proteasa de la invención puede exhibir una actividad relativa a pH 9 y 80°C de al menos 0,40, preferiblemente de al menos 0,45, 0,50, 0,55, 0,60, 0,65, 0,70, 0,75, 0,80, 0,85, 0,90, o de al menos 0,95, el término "relativa" refiriéndose a la actividad máxima medida para la proteasa en cuestión. Para la Proteasa 22, la proteasa L2a, así como la proteasa derivada de *Nocardioopsis dassonvillei*, subespecie *dassonvillei* DSM 43235, la actividad es relativa a la actividad a 80°C que se ajusta a 1.000 (100%), y para la Proteasa 8, y la proteasa derivada de la especie *Nocardioopsis* NRRL 18262, la actividad a 70°C se ajusta a 1.000 (100%), véase los Ejemplos 2, 7, 8, y 9. En otro ejemplo, la proteasa de la invención muestra una actividad relativa a pH 9 y 90°C de al menos 0,10, preferiblemente de al menos 0,15, 0,20, 0,25, 0,30, o de al menos 0,35. En una forma de realización particular, la actividad proteasa es medida usando el ensayo con Protazyme AK del Ejemplo 2.

60 Una selección de proteasas termoestables en relación con las SEC ID N°: 2, 8, 10 o 12 de la invención puede ser realizada como se indica a continuación: Selección de una librería de ADN con iniciadores, por ejemplo cualquiera de las SEC ID N°: 3 o 4, o preferiblemente con la partes maduras de codificación de péptido de cualquiera de las SEC ID N°: 1, 7, 9 o 11; expresión de los clones de hibridación en una cepa adecuada, por ejemplo una cepa de *Bacillus* o *E. coli*. En una fase siguiente, las proteasas expresadas relacionadas con cualquiera de las SEC ID N°: 2, 8, 10 y/o 12 son purificadas, preferiblemente en un procedimiento de micropurificación (véase por ejemplo WO 03/037914), y la cantidad de proteasa activa es determinada para cada candidata mediante el uso del principio muy conocido de titulación de sitio activo (AST) con un inhibidor fuerte de la enzima. En una fase posterior, una cantidad conocida de la enzima es incubada después a una temperatura alta deseada, por ejemplo a 85°C, durante un tiempo deseado, por ejemplo de 2 horas; y la actividad proteasa residual es determinada, por ejemplo por medio de cualquiera de los ensayos

ES 2 315 666 T3

de proteasa descritos aquí, por ejemplo el ensayo con Protazyme AK del Ejemplo 2. La mayor parte del procedimiento puede ser automatizado, y si se desea realizado con la ayuda de robots. La verificación de la termostabilidad se realiza por ejemplo mediante una purificación de la proteasa, y el establecimiento de la T_m por DSC se efectúa tal y como se describe en la parte experimental de la presente.

5

La presente invención se refiere también al uso en alimentos para animales de los polipéptidos de la invención.

El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos pueden ser determinado también por el método Clustal (Higgins, 1989, CABIOS 5: 151-153) usando el software LASERGENE™ MEGALIGN™ (DNASTAR, Inc., Madison, WI) con una tabla de identidad y los siguientes parámetros de alineación múltiples: Penalización de espacio de 10, y penalización de longitud de espacio de 10. Los parámetros de alineación pareados son $K_{tuple}=1$, espacio de penalización=3, ventanas=5, y diagonales=5. El grado de identidad entre dos secuencias de nucleótidos pueden ser determinado mediante el uso del mismo algoritmo y el paquete software tal y como se ha descrito anteriormente con los siguientes ajustes: Penalización de espacio de 10, y penalización de longitud de espacio de 10. Los parámetros de alineación pareados son $K_{tuple}=3$, espacio de penalización=3 y ventanas=20.

15

En una forma de realización particular, los polipéptidos homólogos tienen una secuencia de aminoácidos que difiere de los aminoácidos 1 a 188 de SEC ID N°: 2 o -166 a 188 de SEC ID N°: 2, o de los aminoácidos 1 a 196 de SEC ID N°: 8 o -192 a 196 de SEC ID N°: 8, por

20

(i) no más de 75, 74, 73, 72, 71, 70, 69, 68, 67, 66, 65, 64, 63, 62, 62, 60, 59, 58, 57, 56, 55, 54, 53, 52, 51, 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, o no más de 20 aminoácidos;

25

(ii) no más de veinte, diecinueve, dieciocho, diecisiete, dieciséis, quince, catorce, trece, doce, o no más de once aminoácidos;

(iii) no más de diez, nueve, ocho, siete, seis, cinco, cuatro, tres, dos, o no más de un aminoácido;

30

(iv) diez, o nueve, u ocho, o siete, o seis, o cinco aminoácidos; o

(v) cuatro, o tres, o dos aminoácidos, o un aminoácido.

En una forma de realización particular, los polipéptidos de la presente invención comprenden la secuencia de aminoácidos de las partes de péptido maduro de cualquiera de las SEC ID N°: 2, 8, 10, o 12, o variantes alélicas de las mismas; o fragmentos de éstas que poseen una actividad proteasa.

35

En otra forma de realización preferida, los polipéptidos de la presente invención consisten en las partes de péptido maduras de cualquiera de las SEC ID N°: 2, 8, 10, o 12, o variantes alélicas de éstas; o fragmentos de éstas que poseen una actividad proteasa.

40

Un fragmento de las partes de péptido maduro de cualquiera de las SEC ID N°: 2, 8, 10, o 12 es un polipéptido que posee uno o más aminoácidos eliminados del termino amino y/o carboxilo de estas secuencias de aminoácidos. En una forma de realización, un fragmento contiene al menos 75 residuos aminoácidos, o al menos 100 residuos aminoácidos, o al menos 125 residuos aminoácidos, o al menos 150 residuos aminoácidos, o al menos 160 residuos aminoácidos, o al menos 165 residuos aminoácidos, o al menos 170 residuos aminoácidos, o al menos 175 residuos aminoácidos.

45

Una variante alélica indica cualquiera de las dos o más formas alternativas de un gen ocupando el mismo lugar cromosómico. La variación alélica surge naturalmente a través de la mutación, y puede producir el polimorfismo en las poblaciones. Las mutaciones de genes pueden ser silenciosas (ningún cambio en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que poseen secuencias de aminoácidos alteradas. Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por la variante alélica de un gen.

50

La presente invención también expone polipéptidos aislados que poseen una actividad proteasa y que son codificados por secuencias de ácidos nucleicos que se hibridizan en condiciones de astringencia alta o muy alta con una sonda de ácido nucleico que se hibridiza en las mismas condiciones con (a) nucleótidos 499-1062 de SEC ID N°: 1 y/o nucleótidos 502-1065 de SEC ID N°: 11; (b) una subsecuencia de (a), o (c) una cadena complementaria de (a), o (b) (J. Sambrook, E.F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2a edición, Cold Spring Harbor, New York). En una forma de realización particular la sonda de ácido nucleico es seleccionada entre las secuencias de ácidos nucleicos más arriba de (a), (b), o (c). Los nucleótidos de (a) corresponden a las partes codificantes de péptido maduro.

60

La subsecuencia de los nucleótidos mencionados más arriba en (a) puede ser de al menos 100 nucleótidos, o en otra forma de realización de al menos 200 nucleótidos. Además, la subsecuencia puede codificar un fragmento de polipéptido que posee una actividad proteasa.

65

Las secuencias de ácidos nucleicos de (a) o (b) más arriba, así como las secuencias de aminoácidos maduros correspondientes a las SEC ID N°: 2, 8, 10, o 12, o un fragmento de éstas, pueden ser usadas para diseñar una sonda

ES 2 315 666 T3

de ácido nucleico para identificar y clonar polipéptidos codificantes de ADN que poseen una actividad proteasa a partir de cepas de diferentes géneros o especies según los métodos bien conocidos en la técnica. En particular, tales sondas pueden ser usadas para una hibridación con el ADNc o genómico del género o especie de interés, siguiendo los procedimientos estándares de transferencia de Southern, para identificar y aislar el gen correspondiente de interés.

5 Tales sondas pueden ser considerablemente más cortas que la secuencia entera, pero deberían ser de al menos 15, preferiblemente de al menos 25, y más preferiblemente de al menos 35 nucleótidos de longitud. También se puede usar sondas más largas. Ambas sondas de ADN y ARN pueden ser usadas. Las sondas son marcadas normalmente para detectar el gen correspondiente (por ejemplo, con ^{32}P , ^3H , ^{35}S , biotina o avidina). Tales sondas están incluidas en la presente invención.

10 De esta manera, una librería de ADN genómico o de ADNc obtenida a partir de este otro tipo de organismos puede ser visualizada para el ADN que se hibridiza con las sondas descritas anteriormente y que codifica un polipéptido que posee una actividad proteasa. El ADN genómico u otro de estos otros organismos puede ser separado por electroforesis en gel de agarosa o de poliacrilamida, o mediante otras técnicas de separación. El ADN de las librerías o el ADN separado pueden ser transferido hacia e inmovilizado en nitrocelulosa u otro material de soporte adecuado.

15 Para identificar un clon o ADN que es homólogo a cualquiera de las SEC ID N°: 1, 7, 9, o 11, o una subsecuencia de la misma, el material de soporte es usado en una transferencia de Southern. Para los objetivos de la presente invención, la hibridación indica que la secuencia de ácidos nucleicos se hibridiza en una sonda de ácido nucleico marcada correspondiendo a las secuencias de (a), (b) o (c) más arriba, en condiciones de astringencia muy baja a muy alta. Las moléculas, que la sonda de ácido nucleico hibridiza en estas condiciones, son detectadas por medio de una película de rayos X.

20 En una forma de realización particular, la sonda de ácido nucleico es una secuencia de ácidos nucleicos que codifica los aminoácidos 1 a 188 de SEC ID N°: 2, 1 a 196 de SEC ID N°: 8, 1 a 189 de SEC ID N°: 10, y/o 1 a 188 de SEC ID N°: 12, o subsecuencias de éstas. En otra forma de realización, la sonda de ácido nucleico es nucleótidos 499-1062 de SEC ID N°: 1, 577-1164 de SEC ID N°: 7, 586-1152 de SEC ID N°: 9, y/o 502-1065 de SEC ID N°: 11 (las regiones codificantes de polipéptido maduro).

30 Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, unas condiciones de astringencia muy baja a muy alta son definidas como la prehibridación y la hibridación a 42°C en 5X de SSPE, 0,3% de SDS, 200 $\mu\text{g/ml}$ de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y o bien 25% de formamida para astringencias muy bajas y bajas, 35% de formamida para astringencias medias y medias-altas, o 50% de formamida para astringencias altas y muy altas, siguiendo los procedimientos estándares de la transferencia de Southern.

35 Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, el material de soporte finalmente es lavado tres veces cada 15 minutos usando 0,2 x SSC, 0,2% de SDS, 20% de formamida preferiblemente al menos a 45°C (astringencia muy baja), más preferiblemente al menos a 50°C (astringencia baja), más preferiblemente al menos a 55°C (astringencia media), más preferiblemente al menos a 60°C (astringencia media-alta), incluso más preferiblemente al menos a 65°C (astringencia alta), y de manera más preferida al menos a 70°C (astringencia muy alta).

40 Para sondas cortas de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, las condiciones de astringencia son definidas como prehibridación, hibridación, y post-hibridación de lavado de 5°C a 10°C bajo la T_m calculada por medio del cálculo según Bolton y McCarthy (1962, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 48:1390) en 0.9 M de NaCl, 0.09 M de Tris-HCl, pH 7,6, 6 mM de EDTA, 0,5% NP-40, solución de Denhardt IX, 1 mM de pirofosfato de sodio, 1 mM de fosfato monobásico de sodio, 0.1 mM de ATP, y 0,2 mg de ARN de levadura por ml siguiendo los procedimientos estándares de la transferencia de Southern.

45 Para sondas cortas de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, el material portador es lavado una vez en 6X de SSC más 0,1% de SDS durante 15 minutos y dos veces cada 15 minutos usando 6X de SSC a 5°C a 10°C por debajo de la T_m calculada.

50 La presente invención expone también variantes del polipéptido que poseen una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 1 a 188 de SEC ID N°: 2, 1 a 196 de SEC ID N°: 8, 1 a 189 de SEC ID N°: 10, y/o 1 a 188 de SEC ID N°: 12, comprendiendo una sustitución, delección, y/o inserción de uno o más aminoácidos.

55 Las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos variantes pueden diferir de la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 1 a 188 de SEC ID N°: 2, 1 a 196 de SEC ID N°: 8, 1 a 189 de SEC ID N°: 10, y/o 1 a 188 de SEC ID N°: 12, por una inserción o delección de uno o más residuos aminoácidos y/o la sustitución de uno o más residuos aminoácidos por distintos residuos aminoácidos. En una forma de realización particular, los cambios de aminoácidos son de menor importancia, lo que representa sustituciones de aminoácidos conservadores que no afectan de manera importante el plegamiento y/o actividad de la proteína; delecciones pequeñas, normalmente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; pequeñas extensiones de terminal amino o carboxilo, tal como un residuo de metionina de terminal amino; un péptido pequeño de hasta aproximadamente 20-25 residuos; o una extensión pequeña que facilite la purificación cambiando la carga neta u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión.

65 Ejemplos de sustituciones conservadoras se encuentran en el grupo de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina),

ES 2 315 666 T3

aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina). De esta manera, por ejemplo, la invención se refiere a un polipéptido que posee, o comprende, una secuencia tal y como se ha expuesto en las partes de péptido maduro de cualquiera de las SEC ID N°: 2, 8, 10, o 12, donde las sustituciones de aminoácido conservadoras incluyen reemplazos, unos por otros, entre los aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), entre los aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), entre los aminoácidos polares (glutamina y asparagina), entre los aminoácidos hidrofóbicos (alanina, leucina, isoleucina, y valina), entre los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), y entre los aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina), o cualquier combinación o fragmentos activo de éstos. Las sustituciones de aminoácido que generalmente no alteran la actividad específica son conocidas en la técnica y han sido descritas, por ejemplo, por H. Neurat y R.L. Hill, 1979, en, *The Proteins*, Academic Press, New York. Los cambios que ocurren más frecuentemente son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Nal, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Nal, Ala/Glu, y Asp/Gly así como los mismos al revés.

En una forma de realización particular, los polipéptidos de la invención y para el uso según la invención son estables al ácido. Para los objetivos de la presente, los términos estable al ácido significa que la actividad residual después de 2 horas de incubación a pH 2,0, pH 2,5 o pH 3,0 y 37°C, es de al menos 50%, en comparación con la actividad residual de una muestra correspondiente incubada durante 2 horas a pH 9,0 y 5°C. En una forma de realización particular, la actividad residual es de al menos 60%, 70%, 80% o al menos 90%. Un ensayo adecuado para determinar la estabilidad al ácido es el ensayo de estabilidad al pH del Ejemplo 2.

En otra forma de realización particular, los polipéptidos de la invención y para un uso según la invención tienen una actividad relativa a pH 7,0 de al menos 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,30 o al menos 0,35. La prueba de perfil del pH del Ejemplo 2 es usada para la determinación.

En otras formas de realización particulares también, los polipéptidos de la invención y para el uso según la invención poseen i) una actividad relativa a 60°C y pH 9 de al menos 0,05, 0,10, 0,15 o al menos 0,19; y/o ii) una actividad relativa a 70°C de al menos 0,40, 0,50, o al menos 0,60. La prueba de perfil de la temperatura del Ejemplo 2 es usada para estas determinaciones.

El polipéptido de la invención y para el uso según la invención puede ser un polipéptido bacteriano o fúngico. El polipéptido fúngico puede provenir de un hongo filamentoso o de una levadura.

En formas de realización particulares, el polipéptido de la invención es i) una proteasa bacteriana; ii) una proteasa del *Fylum Actinobacteria* iii) de la clase *Actinobacteria*; iv) del orden de los *Actinomycetales* v) de la familia *Nocardioseae*; vi) del género *Nocardioseae*; y/o una proteasa derivada de vii) las especies *Nocardioseae* tales como *Nocardioseae alba*, *Nocardioseae alkaliphila*, *Nocardioseae antarctica*, *Nocardioseae prasina*, *Nocardioseae cornposta*, *Nocardioseae exhalans*, *Nocardioseae halophila*, *Nocardioseae halotolerans*, *Nocardioseae kunsanensis*, *Nocardioseae listeri*, *Nocardioseae lucentensis*, *Nocardioseae metallicus*, *Nocardioseae synnemataformans*, *Nocardioseae trehalosi*, *Nocardioseae tropica*, *Nocardioseae unidischolae*, *Nocardioseae xinjiangensis*, o *Nocardioseae dassonvillei*, por ejemplo *Nocardioseae dassonvillei*, subespecie *dassonvillei* DSM 43235, especie *Nocardioseae* DSM 16424, o *Nocardioseae alba* DSM 15647; como un polipéptido con cualquiera de las secuencias de aminoácido maduro de SEC ID N°: 2, 8, 10, y 12. En una forma de realización particular, la proteasa deriva de *Nocardioseae alba*, *Nocardioseae antarctica*, o *Nocardioseae dassonvillei*.

La taxonomía anterior es conforme al capítulo: el plan de trabajo del manual por G.M. Garrity & J. G. Holt en *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2001, segunda edición, volumen 1, David R. Boone, Richard W. Castenholz.

Se entenderá que para las especies mencionadas anteriormente, la invención incluye los estados perfecto e imperfecto, y otros equivalentes taxonómicos, por ejemplo, anamorfos, sin tener en cuenta el nombre de las especies por las que se conocen. Aquellos expertos en la técnica reconocerán fácilmente la identidad de los equivalentes apropiados.

Las cepas de estas especies son fácilmente accesibles al público en numerosas colecciones de cultivo, como la American Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), y Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

Además, tales polipéptidos pueden ser identificados y obtenidos a partir de otras fuentes incluyendo microorganismos aislados de la naturaleza (por ejemplo, tierra, abonos, agua, etc.) mediante el uso de las sondas mencionadas más arriba. Las técnicas para aislar microorganismos de sus hábitats naturales son conocidas en el arte. La secuencia de ácidos nucleicos pueden entonces ser derivada por medio de una selección de forma similar de una librería genómica o de ADNc de otro microorganismo. Una vez que una secuencia de ácidos nucleicos de codificación de un polipéptido ha sido detectada con la(s) sonda(s), la secuencia puede ser aislada o clonada mediante técnicas conocidas por los especialistas en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook et Al., 1989, *supra*).

Tal y como se define aquí, un polipéptido "aislado" es un polipéptido que no contiene esencialmente otros polipéptidos, por ejemplo, aproximadamente al menos 20% puro, preferiblemente aproximadamente al menos 40% puro, más preferiblemente aproximadamente 60% puro, aún más preferiblemente aproximadamente 80% puro, más preferi-

blemente aproximadamente 90% puro, y de forma aún más preferible aproximadamente 95% puro, determinado por SDS-PAGE.

Los polipéptidos codificados por secuencias de ácidos nucleicos de la presente invención incluyen también polipéptidos fusionados o polipéptidos de fusión divisibles donde otro polipéptido es fundido en el N-terminal o C-terminal del polipéptido o fragmento de éste. Un polipéptido fusionado es producido por fusión de una secuencia de ácidos nucleicos (o de una parte de ésta) de codificación de otro polipéptido con una secuencia de ácidos nucleicos (o una parte de ésta) de la presente invención. Las técnicas para producir polipéptidos de fusión son conocidas en el arte, por ejemplo por PCR, o por enlace de las secuencias codificantes para la codificación de los polipéptidos de tal forma que éstas estén dispuestas en trama y que la expresión del polipéptido fusionado esté controlado por el(los) mismo(s) promotor(es) y terminador.

En otras formas de realización particulares también, la invención excluye una o más de las proteasas derivadas de (i) *Nocardopsis dassonvillei* NRRL 18133 descrita en WO 88/03947; (ii) especie *Nocardopsis* cepa OPC-210 (FERM P-10508) descrita en JP 2-255081-A; (iii) cepa ZIMET 43647 de la especie *Nocardopsis dassonvillei* descrita en DD 20043218. (iv) especie *Nocardopsis* TOA-1 (FERM-P-18676), que está descrita en JP 2003284571; y/o (v) el ADN correspondiente.

20 Secuencias de Ácidos Nucleicos

La presente invención se refiere también a ácidos nucleicos aislados que codifican un polipéptido de la presente invención. Las secuencias de ácidos nucleicos particulares de la invención son nucleótidos 499-1062 de SEC ID N°: 1, 577-1164 de SEC ID N°: 7, 586-1152 de SEC ID N°: 9, y/o 502-1065 de SEC ID N°: 11; correspondientes a las regiones de codificación de polipéptido maduro de SEC ID N°: 2, 8, 10, y 12, respectivamente. La presente invención incluye también secuencias de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido que posee la secuencia de aminoácidos de las partes de péptido maduro de cualquiera de las SEC ID N°: 2, 8, 10, y 12, pero las cuales difieren de las partes correspondientes de SEC ID N°: 1, 7, 9, y 11, respectivamente, en virtud de la degeneración del código genético. La presente invención se refiere también a subsecuencias de SEC ID N°: 1 7, 9, y 11, que codifican fragmentos de SEC ID N°: 2, 8, 10, y 12, respectivamente, que poseen una actividad proteasa.

Una subsecuencia de SEC ID N°: 1 7, 9, y 11, es una secuencia de ácidos nucleicos englobada por SEC ID N°: 1, 7, 9, y 11, respectivamente, excepto que uno o más nucleótidos del extremo 5' y/o 3' ha sido eliminado. Preferiblemente, una subsecuencia contiene al menos 225 nucleótidos, más preferiblemente al menos 300 nucleótidos, incluso más preferiblemente al menos 375, 450, 500, 531, 600, 700, 800, 900 o 1000 nucleótidos.

La presente invención expone también secuencias de nucleótidos que poseen un grado de identidad para los nucleótidos 499-1062 de SEC ID N°: 1 y/o 502-1065 de SEC ID N°: 11 de al menos el 72%. En unas formas de realización particulares, el grado de identidad de cualquiera de estos nucleótidos es de al menos 72%, 74%, 76%, 78%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o de al menos 99%.

La presente invención expone también secuencias de ácidos nucleicos mutantes comprendiendo al menos una mutación en las partes codificantes de péptido maduro de cualquiera de las SEC ID N°: 1 7, 9, o 11, donde la secuencia de ácidos nucleicos mutante codifica un polipéptido que (i) se compone de las partes de péptido maduro de cualquiera de las SEC ID N°: 2, 8, 10, y 12, respectivamente, o (ii) es una variante de cualquiera de las secuencias de (i), donde la variante comprende una sustitución, delección, y/o inserción de uno o más aminoácidos, o (iii) es una variante alélica de cualquiera de las secuencias de (i), o (iv) es un fragmento de cualquiera de las secuencias de (i).

Las técnicas usadas para aislar o clonar una secuencia de ácidos nucleicos de codificación de un polipéptido son conocidas en el estado de la técnica e incluyen el aislamiento de ADN genómico, la preparación de ADNc, o una combinación de éstos. La clonación de las secuencias de ácidos nucleicos de la presente invención de tal ADN genómico puede ser efectuada, por ejemplo, usando la conocida reacción en cadena de polimerasa (PCR) o de la selección de anticuerpos de librerías de expresión para detectar fragmentos de ADN clonado con características estructurales compartidas. Véase, por ejemplo, Innis *et al.*, 1990, PCR: A Guide to Methods and Application, Academic Press, New York. Se pueden usar otros procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos como la reacción en cadena de la ligasa (LCR), transcripción activada ligada (LAT) y amplificación basada en una secuencia de ácidos nucleicos (NASBA). La secuencia de ácidos nucleicos puede ser clonada a partir de una cepa de *Nocardopsis* u otra o de un organismo relacionado y por lo tanto, por ejemplo, puede ser un alélico o variante de especie de la región codificante de polipéptido de la secuencia de ácidos nucleicos.

Los términos "secuencia de ácidos nucleicos" como se utiliza en este caso se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que es esencialmente libre de otras secuencias de ácidos nucleicos, por ejemplo, aproximadamente al menos 20% pura, preferiblemente aproximadamente al menos 40% pura, más preferiblemente aproximadamente al menos 60% pura, aún más preferiblemente aproximadamente al menos 80% pura, y de manera más preferida aproximadamente al menos 90% pura determinada por electroforesis de agarosa. Por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos aislada puede ser obtenida por medio de unos procedimientos de clonación estandar usados en ingeniería genética para recolocar la secuencia de ácidos nucleicos desde su ubicación natural hasta un sitio diferente donde se reproducirá. Los procedimientos de clonación pueden implicar la escisión y el aislamiento de un fragmento de ácido nucleico deseado

comprendiendo la secuencia de ácidos nucleicos de codificación del polipéptido, la inserción del fragmento en una molécula del vector, y la incorporación del vector recombinante en una célula huésped donde varias copias o clones de la secuencia de ácidos nucleicos serán replicadas. La secuencia de ácidos nucleicos puede ser de origen genómico, de ADNc, ARN, semisintético, sintético, o de cualquier combinación de éstos.

5 Una modificación de una secuencia de ácidos nucleicos de codificación de un polipéptido de la presente invención puede ser necesaria para la síntesis de polipéptidos esencialmente similares al polipéptido. Los términos “esencialmente similares” al polipéptido se refieren a unas formas de polipéptido obtenidas de manera no natural. Estos polipéptidos pueden diferir en una forma de ingeniería del polipéptido aislado de su fuente nativa, por ejemplo, variantes que difieren en una actividad específica, termostabilidad, pH óptimo, alergenicidad, o similar. La secuencia variante puede ser construida en base a la secuencia de ácidos nucleicos presentada como la parte codificante del polipéptido de SEC ID N°: 1, 7, 9 y/u 11, por ejemplo, una subsecuencia de ésta, y/o por introducción de sustituciones de nucleótidos que no implican otra secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado por la secuencia de ácidos nucleicos, sino que corresponden al uso del codón del organismo huésped destinado a la producción de la proteasa, o por introducción de sustituciones de nucleótido que pueden formar una secuencia de aminoácidos diferente. Para una descripción general de las sustituciones de nucleótidos, véase, por ejemplo, Ford *et al.*, 1991, Protein Expression and Purification 2: 95-107. Los polipéptidos hipoalergénicos, por ejemplo, pueden ser preparados como se ha descrito anteriormente.

20 Será evidente para los expertos en la técnica que tales sustituciones pueden realizarse fuera de las regiones críticas para la función de la molécula y seguir formando un polipéptido activo. Los residuos de aminoácidos esenciales para la actividad del polipéptido codificado por la secuencia de ácidos nucleicos aislada de la invención, y por lo tanto preferiblemente no sometida a una sustitución, pueden ser identificados según los procedimientos conocidos en la técnica, como una mutagénesis dirigida en el sitio o mutagénesis por barrido de alanina (véase, por ejemplo, Cunningham y Wells, 1989, Science 244: 1081-1085). En esta última técnica, las mutaciones son introducidas en cada residuo cargado positivamente en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes son probadas para determinar una actividad proteasa para identificar residuos aminoácidos que son esenciales para la actividad de la molécula. Los sitios de interacción proteasa-sustrato pueden ser determinados también por análisis de la estructura tridimensional determinada por tales técnicas como el análisis de resonancia magnética nuclear, marcado por cristalografía o fotoafinidad (véase por ejemplo, de Vos *et al.*, 1992, Science 255: 306-312; Smith *et al.*, 1992, Journal of Molecular Biology 224: 899-904; Wlodaver *et al.*, 1992, FEBS Letters 309: 59-64).

También se describen aquí secuencias de ácidos nucleicos aisladas codificantes de un polipéptido de la presente invención, que se hibridizan en condiciones de astringencia muy baja, preferiblemente en condiciones de astringencia baja, más preferiblemente en condiciones de astringencia media, más preferiblemente en condiciones de astringencia media-alta, aún más preferiblemente en condiciones de astringencia alta, y más preferiblemente en condiciones de astringencia muy alta con una sonda de ácidos nucleicos que se hibridiza en las mismas condiciones con la secuencia de ácidos nucleicos, preferiblemente la parte codificante de péptido maduro de cualquiera de las SEC ID N°: 1, 7, 9, u 11, o de sus cadenas complementarias; o variantes alélicas y subsecuencias de éstas (Sambrook *et al.*, 1989, *supra*), tal como se define aquí.

También se describen aquí secuencias de ácidos nucleicos aisladas producidas por (a) hibridación de un ADN en condiciones de astringencia muy baja, baja, media, media-alta, alta, o muy alta con (i) nucleótidos 499-1062 de SEC ID N°: 1, 577-1164 de SEC ID N°: 7, 586-1152 de SEC ID N°: 9, y/o 502-1065 de SEC ID N°: 11, (ii) una subsecuencia de (i), o (iii) una cadena complementaria de (i), o (ii); y (b) aislamiento de la secuencia de ácidos nucleicos. La subsecuencia es preferiblemente una secuencia de al menos 100 nucleótidos tal como una secuencia que codifica un fragmento de polipéptido que posee una actividad proteasa.

50 *Métodos para producir secuencias de ácidos nucleicos mutantes*

La presente invención expone también métodos para producir una secuencia de ácidos nucleicos mutante, comprendiendo la introducción de al menos una mutación en la secuencia codificante de polipéptido maduro de cualquiera de las SEC ID N°: 1, 7, 9, u 11, o una subsecuencia de éstas, donde la secuencia de ácidos nucleicos mutante codifica un polipéptido que consiste en los péptidos maduros de cualquiera de las SEC ID N°: 2, 8, 10, o 12, respectivamente; o un fragmento de éste que posee una actividad proteasa.

La introducción de una mutación en la secuencia de ácidos nucleicos para cambiar un nucleótido por otro nucleótido puede ser realizada por mutagénesis dirigida por medio de cualquier método conocido en la técnica. Resulta particularmente útil el procedimiento en el que se utiliza un vector de ADN bicatenario superenrollado con un inserto de interés y dos iniciadores sintéticos conteniendo la mutación deseada. Los iniciadores oligonucleótidos, cada uno complementario de unas cadenas opuestas del vector, se extienden durante una variación cíclica de la temperatura mediante una polimerasa de ADN *Pfu*. Con la incorporación de los iniciadores, se genera un plásmido mutado conteniendo cortes fraccionados. Después de la variación cíclica de la temperatura, el producto es tratado con *DpnI* que es específico al ADN metilado y hemimetilado para digerir el molde de ADN progenitor y seleccionar el ADN sintetizado conteniendo la mutación. Se pueden usar también otros procedimientos conocidos en el estado de la técnica.

Constructos de ácidos nucleicos

La presente invención se refiere también a constructos de ácidos nucleicos comprendiendo una secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención enlazada operativamente con una o más secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada en condiciones compatibles con las secuencias de control. Se entenderá con la expresión que se incluye cualquier fase implicada en la producción del polipéptido incluyendo, pero no limitándose a éstos, la transcripción, modificación postranscripcional, traslación, modificación postraslacional, y secreción.

“Constructo de ácido nucleico” es definido aquí como una molécula de ácido nucleico, sea de una sola o de doble cadena, que es aislado de un gen producido naturalmente o que ha sido modificado para contener segmentos de ácido nucleico combinados y superpuestos en una forma tal que éstos, en una forma distinta, no existirían en la naturaleza. Los términos constructo de ácido nucleico es sinónimo de los términos cassette de expresión cuando el constructo de ácido nucleico contiene todas las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia codificante de la presente invención. Los términos “secuencia codificante” son definidos aquí como una secuencia de ácidos nucleicos que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de su producto proteico. Los límites de la secuencia codificante son determinados generalmente por un sitio de unión de ribosoma (procariotas) o por el codón de inicio ATG (eucariotas) localizado exactamente arriba del marco de lectura abierto en el extremo 5' del ARNm y una secuencia terminadora de transcripción localizada exactamente debajo del marco de lectura abierto en el extremo 3' del ARNm. Una secuencia codificante puede incluir, pero no se limita a éstos, ADN, ADNc, y secuencias de ácidos nucleicos recombinantes.

Una secuencia de ácidos nucleicos aislada de codificación de un polipéptido de la presente invención puede ser manipulada en una variedad de formas proporcionadas para la expresión del polipéptido. La manipulación de la secuencia de ácidos nucleicos antes de su inserción en un vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para modificar las secuencias de ácidos nucleicos utilizando métodos de ADN recombinante son bien conocidos en la técnica.

Se entiende que los términos “secuencias de control” incluyen aquí todos los componentes necesarios o ventajosos para la expresión de un polipéptido de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa o extraña a la secuencia de ácidos nucleicos codificante del polipéptido. Tales secuencias de control incluyen, pero sin limitarse a ellos, una guía, una secuencia de poliadenilación, una secuencia de propéptido, un promotor, una secuencia de péptido señal, y un terminador de transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor, y una señales de parada transcripcional y traslacional. Las secuencias de control pueden estar provistas de enlaces con el fin de introducir unos sitios de restricción específicos que faciliten la ligadura de las secuencias de control con la región codificante de la secuencia de ácidos nucleicos de codificación de un polipéptido. Los términos “enlazado operativamente” son definidos aquí como una configuración donde una secuencia de control está dispuesta de manera apropiada en una posición relativa a la secuencia codificante de la secuencia de ADN para que la secuencia de control dirija la expresión de un polipéptido.

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

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

Unos ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácido nucleico de la presente invención en una célula huésped de hongo filamentoso son promotores obtenidos a partir de los genes para la amilasa TAKA de *Aspergillus oryzae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, alfa-amilasa estable ácida de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger* o de *Aspergillus awamori* (glaA), lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, isomerasa de fosfato triosa de *Aspergillus oryzae*, acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, y proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), así como el promotor NA2-tpi (un híbrido de los promotores de los genes para la alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* e isomerasa fosfato triosa de *Aspergillus oryzae*), y promotores mutantes, truncados, e híbridos de éstos.

En un huésped de levadura, los promotores útiles son obtenidos a partir de los genes para la enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), galactocinasa de *Saccharomyces cerevisiae* (GAL1), dehidrogenasa de dehidroge-

ES 2 315 666 T3

nasa/gliceraldehido-3-fosfato de alcohol de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH2/GAP), y kinasa de 3-fosfoglicerato de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros promotores útiles para las células huéspedes de levadura son descritos por Romanos *et al.*, 1992, *Yeast* 8: 423-488.

5 La secuencia de control también puede ser una secuencia terminadora de transcripción adecuada, una secuencia reconocida por una célula huésped para terminar la transcripción. La secuencia terminadora es enlazada operativamente al terminal 3' de la secuencia de ácidos nucleicos de codificación del polipéptido. Cualquier terminador que sea funcional en la célula huésped seleccionada puede ser usada en la presente invención.

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

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

20 Los terminadores preferidos para células huéspedes bacterianas, como una célula huésped de *Bacillus*, son los terminadores del gen de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (amyL), el gen de amilasa maltogénico de *Bacillus stearothermophilus* (amyM), o el gen de alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (amyQ).

25 La secuencia de control también puede ser una secuencia guía adecuada, una región no trasladada de un ARNm que es importante para la traslación por la célula huésped. La secuencia guía es enlazada operativamente al terminal 5' de la secuencia de ácidos nucleicos de codificación del polipéptido. Cualquier secuencia guía funcional en la célula huésped seleccionada puede ser usada en la presente invención.

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

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

40 La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia enlazada operativamente al terminal 3' de la secuencia de ácidos nucleicos, la cual, cuando es transcrita, es reconocida por la célula huésped como una señal para la adición de residuos de poliadenosina al ARNm transcrito. Cualquier secuencia de poliadenilación que sea funcional en la célula huésped de elección puede ser usada en la presente invención.

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

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

55 La secuencia de control también puede ser una región codificante de péptido señal que codifica una secuencia de aminoácidos enlazada al terminal amino de un polipéptido y dirige el polipéptido codificado en la vía secretora de la célula. El extremo 5' de la secuencia codificante de la secuencia de ácidos nucleicos puede contener de forma intrínseca una región codificante de péptido señal enlazada naturalmente en un marco de lectura de traslación con el segmento de la región codificante que codifica el polipéptido segregado. De forma alternativa, el extremo 5' de la secuencia codificante puede contener una región codificante de péptido señal que es extraña a la secuencia codificante. La región codificante extraña de péptido señal puede ser requerida en el sitio donde la secuencia codificante no contenga naturalmente una región codificante de péptido señal. De forma alternativa, la región codificante extraña del péptido señal simplemente puede reemplazar la región codificante natural del péptido señal con el fin de aumentar la secreción del polipéptido. No obstante, cualquier región codificante del péptido señal que dirija el polipéptido expresado dentro de la vía secretora de una célula huésped de selección puede ser usada en la presente invención.

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

65 Las regiones codificantes de péptido señal eficaces para células huéspedes de hongo filamentoso son las regiones codificantes de péptido señal obtenidas a partir de los genes para la amilasa TAKA de *Aspergillus oryzae*, amilasa

ES 2 315 666 T3

neutra de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, celulasa de *Humicola insolens*, y lipasa de *Humicola lanuginosa*.

5 Los péptidos señal útiles para células huéspedes de levadura son obtenidos a partir de los genes para un factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* e invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otras regiones codificantes de péptido señal útiles son descritas por Romanos *et al.*, 1992, *supra*.

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

15 En una forma de realización preferida, la región codificante de propéptido está constituida por nucleótidos 1-498 de SEC ID N°: 1 que codifican los aminoácidos -166 a -1 de SEC ID N°: 2, nucleótidos 82-576 de SEC ID N°: 7 que codifican aminoácidos -165 a -1 de SEC ID N°: 8, nucleótidos 88-585 de SEC ID N°: 9 que codifican aminoácidos -166 a -1 de SEC ID N°: 10, y nucleótidos 1-501 de SEC ID N°: 11 que codifican aminoácidos -167 a -1 de SEC ID N°: 12.

20 En una forma de realización preferida, la región codificante del péptido señal está constituida por nucleótidos 1-81 de SEC ID N°: 7 que codifican los aminoácidos 1-29 de SEC ID N°: 8, o nucleótidos 1-87 de SEC ID N°: 9 que codifican los aminoácidos 1-29 de SEC ID N°: 10.

25 En el terminal amino de un polipéptido donde están presentes ambas regiones del péptido señal y propéptido, la región del propéptido está situada cerca del terminal amino de un polipéptido y la región del péptido señal está situada cerca del terminal amino de la región del propéptido.

30 También puede ser deseable añadir secuencias reguladoras que permitan la regulación de la expresión del polipéptido relativa al crecimiento de la célula huésped. Unos ejemplos de sistemas reguladores son los que producen la expresión del gen que debe ser activada o desactivada en respuesta a un estímulo químico o físico, incluyendo la presencia de un compuesto regulador. Los sistemas reguladores en sistemas procarióticos incluyen los sistemas de operadores lac, tac, y trp. En la levadura, el sistema ADH2 o sistema GAL1 pueden ser usados. En hongos filamentosos, el promotor de alfa-amilasa TAKA, promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger*, y promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae* pueden ser usados como secuencias reguladoras. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son las que permiten una amplificación génica. En sistemas eucarióticos, estos incluyen el gen de reductasa dihidrofolato que es amplificado en presencia de metotrexato, y los genes de metalotioneína que son amplificados con metales pesados. En estos casos, la secuencia de ácidos nucleicos de codificación del polipéptido sería enlazada operativamente con la secuencia reguladora.

Vectores de expresión

45 La presente invención se refiere también a vectores de expresión recombinantes comprendiendo una secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención, un promotor, y señales de parada transcripcional y traslacional. Las varias secuencias de control y de ácidos nucleicos descritas anteriormente pueden estar unidas entre sí para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más sitios de restricción adecuados para permitir la inserción o sustitución de la secuencia de ácidos nucleicos de codificación del polipéptido en tales sitios. De manera alternativa, la secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención puede ser expresada mediante la inserción de la secuencia de ácidos nucleicos o de un constructo de ácidos nucleicos comprendiendo la secuencia en un vector apropiado para la expresión. Con la creación del vector de expresión, la secuencia codificante se dispone en el vector para que la secuencia codificante sea enlazada operativamente con las secuencias de control apropiadas para la expresión.

55 El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o virus) que puede ser sometido de manera apropiada a procedimientos de ADN recombinante y producir la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos. La selección del vector dependerá generalmente de la compatibilidad del vector con la célula huésped donde el vector debe ser introducido. Los vectores pueden ser plásmidos lineales o circulares cerrados.

60 El vector puede ser un vector de replicación de forma autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma, o una cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. De forma alternativa, el vector puede ser un vector que, cuando se introduce en la célula huésped, se integra en el genoma y es replicado con el(los) cromosoma(s) en los que se ha integrado. Además, se puede utilizar un vector o plásmido único o dos o más vectores o plásmidos que contienen juntos el ADN total que debe ser introducido en el genoma de la célula huésped, o un transposón.

65 Los vectores de la presente invención contienen preferiblemente uno o más marcadores seleccionables que permiten una selección fácil de células transformadas. Un marcador seleccionable es un gen cuyo producto proporciona una

ES 2 315 666 T3

resistencia biocida o virica, una resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos, y similares. Unos ejemplos de marcadores seleccionables bacterianos son los genes *dal* de *Bacillus subtilis* o *Bacillus licheniformis*. Los marcadores adecuados para las células huéspedes de levadura son ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 y URA3. Los marcadores seleccionables para un uso en una célula huésped de hongo filamentoso incluyen, pero no se limitan a éstos, amdS (acetamidasa), argB (ornitina carbamoiltransferasa), bar (fosfotricina acetiltransferasa), hygB (higromicina fosfotransferasa), niaD (nitrato reductasa), pyrG (orotidina-5'-fosfato decarboxilasa), sC (sulfato adeniltransferasa), trpC (antranilato sintasa), así como equivalentes de éstos. Se prefiere el uso en una célula de *Aspergillus* de los genes amdS y pyrG de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y el gen bar de *Streptomyces hygroscopicus*.

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

15 Para una integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede depender de la secuencia de ácidos nucleicos de codificación del polipéptido o de cualquier otro elemento del vector para una integración estable del vector en el genoma por recombinación homóloga o no homóloga. De manera alternativa, el vector puede contener otras secuencias de ácidos nucleicos para dirigir la integración por recombinación homóloga en el genoma de la célula huésped. Las secuencias de ácidos nucleicos adicionales permiten integrar el vector en el genoma de la célula huésped en un(os) sitio(s) preciso(s) en el cromosoma(s). Para aumentar la probabilidad de integración de un sitio preciso, los elementos integracionales deberían contener preferiblemente un número suficiente de ácidos nucleicos, como 100 a 1,500 pares de bases, preferiblemente 400 a 1,500 pares de bases, y más preferiblemente 800 a 1,500 pares de bases, que son altamente homólogas a la secuencia de destino correspondiente para aumentar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos integracionales pueden ser cualquier secuencia homóloga a la secuencia de destino en el genoma de la célula huésped. Además, los elementos integracionales pueden ser secuencias de ácidos nucleicos de no codificación o de codificación. Por otra parte, el vector puede ser integrado en el genoma de la célula huésped mediante una recombinación no homóloga.

20 Para una replicación autónoma, el vector también puede incluir un origen de replicación que permite al vector replicarse de forma autónoma en la célula huésped en cuestión. Unos ejemplos de orígenes bacterianos de replicación son los orígenes de replicación de los plásmidos pBR322, pUC19, pACiC177, y pACYC184 permitiendo una replicación en *E. coli*, y pUB110, pE194, pTA1060, y pAM β 1 permitiendo una replicación en *Bacillus*. Unos ejemplos de los orígenes de replicación para usar en una célula huésped de levadura son el origen de 2 micras de replicación, ARS1, ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3, y la combinación de ARS4 y CEN6. El origen de replicación puede ser un vector que posee una mutación que hace que éste funcione sensible a una temperatura en la célula huésped (véase, por ejemplo, Ehrlich, 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences EEUU 75: 1433).

25 Más de una copia de una secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención puede ser insertada en la célula huésped para aumentar la producción del producto genético. Un aumento del número de copias de la secuencia de ácidos nucleicos puede ser obtenido integrando al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped o mediante la inclusión de un gen marcador seleccionable, amplificable con la secuencia de ácidos nucleicos donde las células conteniendo copias amplificadas del gen marcador seleccionable, y por lo tanto copias adicionales de la secuencia de ácidos nucleicos, pueden ser seleccionadas por medio del cultivo de las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

30 Los procedimientos usados para enlazar los elementos descritos anteriormente para construir los vectores de expresión recombinante de la presente invención son conocidos por un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

35 La proteasa también puede ser coexpresada con al menos otra enzima de interés para los alimentos para animales, tal como la alfa-amilasa (EC 3.2.1.1), fitasa (EC 3.1.3.8 o 3.1.3.26); xilanasas (EC 3.2.1.8); galactanasas (EC 3.2.1.89); alfa-galactosidasas (EC 3.2.1.22); proteasa (EC 3.4.-.-), fosfolipasa A1 (EC 3.1.1.32); fosfolipasa A2 (EC 3.1.1.4); lisofosfolipasa (EC 3.1.1.5); fosfolipasa C (3.1.4.3); fosfolipasa D (EC 3.1.4.4); y/o beta-glucanasa (EC 3.2.1.4 o EC 3.2.1.6).

40 Las enzimas pueden ser coexpresadas a partir de distintos vectores, de un vector, o por medio de una mezcla de ambas técnicas. Cuando se usan distintos vectores, los vectores pueden tener distintos marcadores seleccionables, y distintos orígenes de replicación. Cuando se usa sólo un vector, los genes pueden ser expresados a partir de uno o más promotores. Si se clonan en función de la regulación de un promotor (di- o multi-cistrónico), el orden en el que los genes son clonados puede afectar los niveles de expresión de las proteínas. La proteasa también puede ser expresada como una proteína de fusión, es decir que el gen de codificación de la proteasa es fusionado en la estructura con el gen de codificación de otra proteína. Esta proteína puede ser otra enzima o un dominio funcional de otra enzima.

Células huéspedes

45 La presente invención se refiere también a células huésped recombinantes, comprendiendo una secuencia de ácidos nucleicos de la invención, que son usadas de manera ventajosa en la producción recombinante de los polipéptidos. Un vector comprendiendo una secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención es introducido en una célula huésped para mantener el vector como un integrante cromosómico o un vector extracromosómico de autoreplicación tal y como

ES 2 315 666 T3

se ha descrito anteriormente. Los términos “célula huésped” se refieren a cualquier progenie de una célula madre que no es idéntica a la célula madre a causa de las mutaciones que ocurren durante la replicación. La elección de una célula huésped dependerá en gran medida del gen de codificación del polipéptido y de su fuente.

5 La célula huésped puede ser un microorganismo unicelular, por ejemplo, un procarionta, o un microorganismo no unicelular, por ejemplo, un eucariota.

Las células unicelulares útiles son células bacterianas como bacterias gram positivas incluyendo, pero sin limitarse a éstas, una célula *Bacillus*, o una célula *Streptomyces*, o células de bacterias del ácido láctico; o bacterias gram negativas tales como bacterias de ácido (ático de la especie *E. coli* y *Pseudomonas*, incluyendo pero sin limitarse a especies de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, y *Enterococcus*.

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

20 La célula huésped puede ser un eucariota, como una célula de animal no humano, una célula de insecto, una célula vegetal, o una célula de hongos.

En una forma de realización particular, la célula huésped es una célula de hongos. “Hongos” como se utiliza en este caso incluye el phyla Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, y Zygomycota (Hawksworth *et al.*, In, Ainsworth and Bisby's *Dictionary of The Fungi*, 8ª edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, Reino Unido) así como el Oomycota (como citado en Hawksworth *et al.*, 1995, *supra*, página 171) y todos los hongos mitosporicos (Hawksworth *et al.*, 1995, *supra*).

30 En otra forma de realización particular, la célula huésped fúngica es una célula de levadura. “Levadura” tal y como se utiliza en este caso incluye la levadura ascosporogénea (Endomicetales), levadura basidiosporogénea, y levadura perteneciente a los hongos imperfecti (Blastomicetes). Como la clasificación de la levadura puede cambiar en el futuro, para los objetivos de esta invención, la levadura será definida tal y como está descrita en *Biology and Activities of Yeast* (Skinner, F.A., Passmore, S.M., y Davenport, R.R., eds, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series N° 9, 1980).

35 La célula huésped de levadura puede ser una célula *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o célula de *Yarrowia*.

40 La célula huésped de hongo puede ser una célula de hongo filamentoso. Los “Hongos filamentosos” incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycota y Oomycota (como han sido definidas por Hawksworth *et al.*, 1995, *supra*). Los hongos filamentosos están caracterizados por una pared micelial compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano, y otros complejos polisacáridos. El crecimiento vegetativo se efectúa por alargamiento hifal y el catabolismo de carbono es estrictamente aeróbico. Al contrario, el crecimiento vegetativo por levaduras como la *Saccharomyces cerevisiae* se realiza por injerto de un talo unicelular y el catabolismo de carbono puede ser fermentativo.

Unos ejemplos de células huéspedes de hongo filamentoso, pero sin limitarse a éstas, son las células de las especies *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Thielavia*, *Tolyopcladium*, o *Trichoderma*.

50 La células de hongos pueden ser transformadas por un procedimiento que implica la formación de protoplastos, la transformación de los protoplastos, y la regeneración de la pared celular según una forma conocida *per se*. Los procedimientos adecuados de transformación de las células huéspedes de *Aspergillus* están descritos en EP 238 023 y Yelton *et al.*, 1984, *Proceedings of the National Academy of Sciences EEUU* 81: 1470-1474. Los métodos adecuados para transformar las especies de *Fusarium* ha sido descritos por Malardier *et al.*, 1989, gen 78: 147-156 y en WO 96/00787. La levadura puede ser transformada mediante el uso de los procedimientos descritos por Becker y Guarente, en Abelson, J.N. y Simon, M.L., editores, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Volume 194*, pp 182-187, Academic Press, Inc., New York; Ito *et al.*, 1983, *Journal of Bacteriology* 153: 163; y Hinnen *et al.*, 1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 75: 1920.

60

Métodos de producción

65 La presente invención también se refiere a métodos para la producción de un polipéptido de la presente invención comprendiendo (a) el cultivo de una cepa, la cual en su forma de tipo salvaje, es capaz de producir el polipéptido; y (b) la recuperación del polipéptido. Preferiblemente, la cepa es del género *Nocardiosis*, más preferiblemente *Nocardiosis dassonvillei*, *Nocardiosis alba*, o *Nocardiosis antarctica*, más preferiblemente *Nocardiosis dassonvillei*, subespecie *dassonvillei*.

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

5 La presente invención expone también unos métodos para la producción de un polipéptido de la presente invención comprendiendo (a) el cultivo de una célula huésped en condiciones propicias para la producción del polipéptido, donde la célula huésped comprende una secuencia de ácidos nucleicos mutante comprendiendo al menos una mutación en los nucleótidos 499-1062 de SEC ID N°: 1, 577-1164 de SEC ID N°: 7, 586-1152 de SEC ID N°: 9, y/o 502-1065 de SEC ID N°: 11, donde la secuencia de ácidos nucleicos mutante codifica un polipéptido que (i) consiste en los aminoácidos 1 a 188 de SEC ID N°: 2, 1 a 196 de SEC ID N°: 8, 1 a 189 de SEC ID N°: 10, y/o 1 a 188 de SEC ID N°: 12, o 10 (ii) es una variante de cualquiera de las secuencias de (i), donde la variante comprende una sustitución, delección, y/o inserción de uno o más aminoácidos, o (iii) es una variante alélica de cualquiera de las secuencias de (i), o (iv) es un fragmento de cualquiera de las secuencias de (i).

15 En los métodos de producción de la presente invención, las células son cultivadas en un medio nutritivo adecuado para la producción del polipéptido usando métodos conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, la célula puede ser cultivada mediante un cultivo en un frasco de agitación, por fermentación a pequeña escala o a gran escala (incluyendo fermentaciones continuas, por lotes, en discontinuo, o en estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales realizada en un medio adecuado y en condiciones que permitan expresar y/o aislar el polipéptido. El cultivo se desarrolla en un medio nutritivo adecuado comprendiendo fuentes de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, mediante el uso de procedimientos conocidos en la técnica. Los medios adecuados están disponibles provistos por proveedores comerciales o pueden ser preparados según las composiciones publicadas (por ejemplo, en los catálogos de American Type Culture Collection). Si el polipéptido es segregado en el medio nutritivo, el polipéptido puede ser recuperado directamente del medio. Si el polipéptido no es segregado, éste puede ser recuperado a partir de los lisatos de la célula. 25

Los polipéptidos pueden ser detectados usando métodos conocidos en la técnica que son específicos a los polipéptidos. Estos métodos de detección pueden incluir el uso de anticuerpos específicos, la formación de un producto, o la desaparición de un sustrato. Por ejemplo, un ensayo de proteasa puede ser usado para determinar la actividad del polipéptido tal y como está descrito aquí. 30

El polipéptido resultante puede ser recuperado por medio de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido puede ser recuperado del medio nutritivo mediante procedimientos convencionales incluyendo, pero sin limitarse a éstos, centrifugado, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación, o precipitación. 35

Los polipéptidos de la presente invención pueden ser purificados usando una variedad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, sin limitarse a éstos, cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, de afinidad, hidrofóbica de cromatofoco, y exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectrofoque preparatorio), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación de sulfato amónico), SDS-PAGE, o extracción (véase, por ejemplo, Protein Purification, J.-C. Janson y Lars Ryden, editores, Ediciones VCH, New York, 1989). 40

Plantas

La presente invención se refiere también a una planta transgénica, a una parte de planta, o a una célula vegetal que ha sido transformada con una secuencia de ácidos nucleicos de codificación de un polipéptido que posee una actividad proteasa de la presente invención para expresar y producir el polipéptido en cantidades recuperables. El polipéptido puede ser recuperado de la planta o de parte de la planta. De forma alternativa, la planta o parte de planta conteniendo el polipéptido recombinante puede ser usado como tal para mejorar la calidad de un alimento o alimentos, por ejemplo, para mejorar su valor nutritivo, sabor, y propiedades reológicas, o destruir un factor antinutritivo. 50

En una forma de realización particular, el polipéptido está destinado a las vacuolas de almacenamiento del endosperma en semillas. Esto puede obtenerse por sintetización de éste como precursor con un péptido señal adecuado, véase Horvath *et al* en PNAS, Feb. 15, 2000, vol. 97, n° 4, p. 1914-1919.

55 La planta transgénica puede ser dicotiledónea (una dicot) o monocotiledónea (una monocot) o variantes de estas creadas genéticamente. Unos ejemplos de plantas monocotiledóneas son hierbas, como pastos (pasto azul, Poa), forraje como *Festuca*, *Lolium*, césped templado, como *Agrostis*, y cereales, p. ejemplo, trigo, avena, centeno, cebada, arroz, sorgo, triticale (híbrido estabilizado de trigo (*Tricum*) y centeno (*Secale*), y maíz (maíz). Unos ejemplos de plantas dicotiledóneas son el tabaco, las leguminosas, como el girasol (*Helianthus*), lupinos de algodón (*Gossypium*), patata, remolacha azucarera, guisantes, habas y soja, y plantas crucíferas (familia Brassicaceae), como la coliflor, semilla de colza, y el organismo de modelo *Arabidopsis thaliana* muy relacionado. Las plantas de bajo fitato tal como están descritas por ejemplo en la patente estadounidense n°. 5,689,054 y patente estadounidense n°. 6,111,168 son ejemplos de plantas creadas genéticamente. 60

65 Unos ejemplos de partes de planta son el vástago, callo, hojas, raíz, frutas, semillas, y tubérculos, así como los tejidos individuales comprendiendo estas partes, por ejemplo epidermis, mesofilo, parénquima, tejidos vasculares, meristemas. Además, unos compartimientos de célula vegetal específicos, como el cloroplasto, apoplasto, mitocondria, vacuola, peroxisomas, y citoplasma son considerados como una parte de planta. Además, cualquier célula vegetal, de

cualquier origen de tejido, es considerada como una parte de planta. Asimismo, las partes de planta como los tejidos específicos y las células aisladas para facilitar el uso de la invención, son consideradas también partes de plantas, por ejemplo embriones, endospermas, aleurona y películas de semillas. También se incluyen en el ámbito de la presente invención la pro genie de tales plantas, partes de planta y células vegetales.

La planta transgénica o célula vegetal de expresión de un polipéptido de la presente invención puede ser construida conforme a los métodos conocidos en la técnica. En resumen, la planta o célula vegetal es construida mediante la incorporación de uno o más constructos de expresión de codificación de un polipéptido de la presente invención en el genoma huésped de la planta y la propagación de la planta modificada o célula vegetal resultante en una planta transgénica o célula vegetal.

Convenientemente, el constructo de expresión es un constructo de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de codificación de un polipéptido de la presente invención enlazado operativamente a unas secuencias reguladoras apropiadas requeridas para la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos en la planta o parte de la planta seleccionada. Además, el constructo de expresión puede comprender un marcador seleccionable útil para identificar células huéspedes en las cuales se ha integrado el constructo de expresión y las secuencias de ADN necesarias para la introducción del constructo en la planta en cuestión (este último depende del método de introducción del ADN que debe ser utilizado).

La selección de secuencias reguladoras, tales como secuencias promotoras y terminadoras y opcionalmente secuencias de señal o de tránsito son determinadas, por ejemplo, en base a, cuándo, dónde, y cómo expresar el polipéptido deseado. Por ejemplo, la expresión del gen de codificación de un polipéptido de la presente invención puede ser constitutiva o inducible, o puede ser desarrollable, específica a una etapa o tejido, y el producto genético puede estar previsto para un tejido específico o una parte de planta tal como semillas u hojas. Las secuencias reguladoras han sido descritas por ejemplo, por Tague *et al.*, 1988, *Plant Physiology* 86: 506.

Para la expresión constitutiva, los siguientes promotores puede ser usados: el promotor 35S-CaMV (Franck *et al.*, 1980, *Cell* 21: 285-294), la ubiquitina de maíz 1 (Christensen AH, Sharrock RA y Quail 1992. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation), o el promotor de actina de arroz 1 (*Plant Mo. Biol.* 18, 675-689.; Zhang W, McElroy D. y Wu R 1991, Analysis of rice Act1 5' region activity in transgenic rice plants. *Plant Cell* 3, 1155-1165). Los promotores específicos a un órgano pueden ser, por ejemplo, un promotor procedente de tejidos sumergidos de almacenamiento como semillas, tubérculos de patata, y frutas (Edwards & Coruzzi, 1990, *Ann. Rev. Genet.* 24: 275-303), o de tejidos sumergidos metabólicos como meristemas (Ito *et al.*, 1994, *Plant Mol. Biol.* 24: 863-878), una semilla promotora específica como la glutelina, prolamina, globulina, o promotora de albúmina de arroz (Wu *et al.*, 1998, *Plant and Cell Physiology* 39: 885-889), un promotor de *Vicia faba* de la legúmina B4 y el gen proteico de semilla desconocida de *Vicia faba* (*Journal of Plant Physiology* 152: 708-711), un promotor de una proteína de cuerpo de aceite de semilla (Chen *et al.*, 1998, *Plant and Cell Physiology* 39: 935-941), el promotor napA de proteína de almacenamiento de *Brassica napus*, o cualquier otro promotor específico de semilla conocido en el estado de la técnica, por ejemplo tal como se describe en WO 91/14772. Además, el promotor puede ser un promotor específico de hoja tal como el promotor rbcS del arroz o del tomate (Kiozuka *et al.*, 1993, *Plant Physiology* 102: 991-1000, el promotor del gen de metiltransferasa de adenina del virus chlorella (Mitra y Higgins, 1994, *Plant Molecular Biology* 26: 85-93), o el promotor de gen aldP procedente del arroz (Kagaya *et al.*, 1995, *Molecular and General Genetics* 248: 668-674), o un promotor inducible enrollado tal como el promotor de patata pin2 (Xu *et al.*, 1993, *Plant Molecular Biology* 22: 573-588). Asimismo, el promotor puede ser inducible por tratamientos abióticos tales como la temperatura, sequía o alteraciones de la salinidad o inducibles por sustancias aplicadas exógenamente que activan el promotor, por ejemplo etanol, estrógenos, hormonas vegetales como etileno, ácido abscísico, ácido giberélico y/o metales pesados.

También se puede usar un elemento intensificador del promotor para conseguir la mayor expresión de la proteasa en la planta. Por ejemplo, el elemento intensificador del promotor puede ser un intrón que es instalado entre el promotor y la secuencia de nucleótidos de codificación de un polipéptido de la presente invención. Por ejemplo, Xu *et al.*, 1993, *supra* revelan el uso del primer intrón del gen de actina de arroz 1 para aumentar la expresión.

Por otra parte, el uso del codón puede ser optimizado para las especies vegetales en cuestión para mejorar la expresión (véase Horvath *et al* en referencia a lo anterior).

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

El constructo de ácidos nucleicos es incorporado en el genoma de la planta según técnicas convencionales conocidas en el estado de la técnica, incluyendo una transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación mediada por virus, microinyección, bombardeo de partículas, transformación biolística y electroporación (Gasser *et al.*, 1990, *Science* 244: 1293; Potrykus, 1990, *Bio/Technology* 8: 535; Shimamoto *et al.*, 1989, *Nature* 338: 274).

Actualmente, la transferencia del gen mediado por *Agrobacterium tumefaciens* es el método seleccionado para generar dicotiledóneas transgénicas (como resumen, véase Hooikas y Schilperoort, 1992, *Plant Molecular Biology* 19: 15-38), y ésta puede ser utilizada también para transformar monocotiledóneas, aunque otros métodos de transformación son generalmente preferidos para estas plantas. Actualmente, el método seleccionado para generar monocotiledóneas

ES 2 315 666 T3

transgénicas, complementando el procedimiento de *Agrobacterium*, es el bombardeo de partículas (partículas microscópicas de oro o de tungsteno revestidas con el ADN transformante) de callos embrionarios o embriones en desarrollo (Christou, 1992, *Plant Journal* 2: 275-281; Shimamoto, 1994, *Current Opinion Biotechnology* 5: 158-162; Vasil *et al.*, 1992, *Bio/Technology* 10: 667-674). Un método alternativo para la transformación de monocotiledóneas se basa en la transformación de protoplastos tal y como han descrito Omirulleh *et al.*, 1993, *Plant Molecular Biology* 21: 415-428.

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

La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención comprendiendo (a) el cultivo de una planta transgénica o de una célula vegetal comprendiendo una secuencia de ácidos nucleicos codificante de un polipéptido que posee una actividad proteasa de la presente invención en condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) la recuperación del polipéptido.

15 *Animales*

La presente invención también se refiere a un animal no humano y a productos o elementos del mismo, cuyos ejemplos son fluidos biológicos como la leche y la sangre, órganos, carne, y células animales. Las técnicas para la expresión de proteínas, por ejemplo en células mamíferas, son conocidas en la técnica, véase por ejemplo el manual sobre la Expresión de Proteínas: un enfoque práctico, Higgins y Hames (eds), Prensa de la Universidad de Oxford (1999), y los otros tres manuales en esta serie relativa a la transcripción del gen, el tratamiento del RNA, y el Tratamiento Postraslaccional. En términos generales, para preparar un animal transgénico, unas células seleccionadas de un animal seleccionado son transformadas con una secuencia de ácidos nucleicos de codificación de un polipéptido que posee una actividad proteasa de la presente invención para expresar y producir el polipéptido. El polipéptido puede ser recuperado del animal, por ejemplo de la leche de animales hembras, o el polipéptido puede ser expresado en beneficio del propio animal, por ejemplo para facilitar la digestión del animal. Unos ejemplos de animales son mencionados más abajo en la sección denominada Alimentos para Animales.

Para producir un animal transgénico con el fin de recuperar la proteasa de la leche del animal, un gen de codificación de la proteasa puede ser insertado en los huevos fertilizados de un animal determinado, por ejemplo mediante el uso de un vector de expresión de transgen que comprenda un promotor de proteínas de leche adecuado y el gen de codificación de la proteasa. El vector de expresión del transgen es microinyectado en los huevos fertilizados, y preferiblemente integrado de forma permanente en el cromosoma. Una vez que el huevo empieza a crecer y a dividirse, el embrión potencial es implantado en una madre portadora, y los animales portadores del transgen son identificados. El animal resultante puede ser multiplicado después por reproducción convencional. El polipéptido puede ser purificado de la leche del animal, véase por ejemplo Meade, H.M. *et al* (1999): Expression of recombinant proteins in the milk of transgenic animals, *Gene expression systems: Using nature for the art of expression*. J. M. Fernández y J. P. Hoeffler (eds.), Academic Press.

Como alternativa, para producir un animal no humano que contenga en el genoma de sus células somáticas y/o germinales, una secuencia de ácidos nucleicos que incluya un constructo de transgen heterólogo con un transgen de codificación de la proteasa, el transgen puede ser enlazado operativamente a una primera secuencia reguladora para una expresión específica de la proteasa en la glándula salival, tal como se describe en WO 00/064247.

45 *Composiciones*

En otro aspecto más, la presente invención se refiere a composiciones comprendiendo un polipéptido de la presente invención.

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

Se proporcionan unos ejemplos más abajo de usos preferidos de polipéptidos o composiciones de polipéptido según la invención.

Alimentos para animales

La presente invención se dirige también a métodos de uso de los polipéptidos de la invención en alimentos para animales, así como a composiciones de alimentos y aditivos alimentarios comprendiendo los polipéptidos de la invención.

El término animal incluye todos los animales, incluyendo seres humanos. Unos ejemplos de animales son no rumiantes y rumiantes. Los animales rumiantes incluyen por ejemplo, animales como ovejas, cabras, caballos, y ganado bovino, por ejemplo ganado bovino para carne, vacas, y terneros jóvenes. En una forma de realización particular, el animal es un animal no rumiante. Los animales no rumiantes incluyen animales monogástricos, por ejemplo cerdos o puercos (incluyendo pero no limitándose a éstos, lechones, cerdos en crecimiento y cerdas); aves de corral como

ES 2 315 666 T3

pavos, patos y pollos (incluyendo pero sin limitarse a éstos, pollos jóvenes, gallinas ponedoras); terneros jóvenes; y peces (incluyendo pero sin limitarse a éstos, salmones, truchas, tilapias, siluros y carpas; y crustáceos (incluyendo aunque sin limitarse a éstos, gambas y camarones).

5 El término alimento o composición de alimento define cualquier compuesto, preparación, mezcla, o composición adecuada para, o destinada a ser ingerido por un animal.

En el uso según la invención, la proteasa puede ser proporcionada al animal antes de, después de, o simultáneamente con la dieta. Esta última es la preferida.

10

En una forma de realización particular, la proteasa, en la forma en la que es añadida al alimento, o incluida en un aditivo alimentario está definida adecuadamente. Definida adecuadamente significa que la preparación de proteasas es al menos 50% pura tal y como se determina por cromatografía de exclusión por tamaño (véase Ejemplo 12 de WO 01/58275). En otras formas de realización particulares la preparación de proteasas es al menos 60, 70, 80, 85, 88, 90, 92, 94, o al menos 95% pura determinada mediante este método.

15

Una preparación de proteasa definida adecuadamente es ventajosa. Por ejemplo, es mucho más fácil dosificar correctamente en el alimento una proteasa que sea esencialmente libre de interferir o contaminar otras proteasas. El término dosis se refiere, en particular, a una forma adecuada para obtener resultados consistentes y constantes, y a la capacidad de optimizar la dosificación en base al efecto deseado.

20

Para su uso en alimentos para animales, sin embargo, la proteasa no necesita ser tan pura; ésta puede por ejemplo incluir otras enzimas, en este caso, ésta podría definirse como una preparación de proteasas.

25

La preparación de proteasas puede ser (a) añadida directamente al alimento (o usada directamente en un proceso de tratamiento de proteínas), o (b) puede ser usada en la producción de una o más composiciones intermedias tales como aditivos alimentarios o premezclas que se añaden posteriormente al alimento (o usada en un proceso de tratamiento). El grado de pureza descrito anteriormente se refiere a la pureza de la preparación de proteasa original, según se use con (a) o (b) más arriba.

30

Las preparaciones de proteasa con purezas de este orden de magnitud son obtenibles en particular mediante el uso de métodos recombinantes de producción, mientras que éstas no pueden ser obtenidas fácilmente y están también expuestas a una variación entre lotes mucho mayor cuando la proteasa es producida por métodos de fermentación tradicional.

35

Por supuesto, la preparación de proteasa puede ser mezclada con otras enzimas.

En una forma de realización particular, la proteasa para un uso según la invención es capaz de solubilizar proteínas. Un ensayo adecuado para determinar una proteína solubilizada está descrito en el Ejemplo 3.

40

La proteína puede ser una proteína animal, como la harina de carne y hueso, y/o la harina de pescado; o puede ser una proteína vegetal.

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

45

Las proteínas vegetales pueden ser derivadas de fuentes de proteína vegetal, tal como las leguminosas y los cereales, por ejemplo materiales procedentes de plantas de las familias *Fabaceae* (*Leguminosae*), *Cruciferaeae*, *Chenopodiaceae*, y *Poaceae*, como la harina de soja, harina de lupino y harina de colza.

50

En una forma de realización particular, la fuente de proteínas vegetales es un material de una o más plantas de la familia *Fabaceae*, por ejemplo soja, lupina, guisantes, o habas.

55

En otra forma de realización particular, la fuente de proteína vegetal es un material de una o más plantas de la familia *Chenopodiaceae*, por ejemplo remolacha, remolacha azucarera, espinaca o quinoa.

Otros ejemplos de fuentes de proteína vegetal son las semillas de colza, semillas de girasol, semillas de algodón y col.

60

La soja es una fuente preferida de proteína vegetal.

Otros ejemplos de fuentes de proteína vegetal son los cereales como la cebada, el trigo, el centeno, la avena, el maíz (maíz), el arroz, el triticale, y el sorgo.

65

El tratamiento según la invención de proteínas con al menos una proteasa de la invención produce una solubilización incrementada de las proteínas.

ES 2 315 666 T3

A continuación se dan ejemplos de % de proteína solubilizada obtenible mediante el uso de las proteasas de la invención en un modelo monogástrico *in vitro*: Al menos 102%, 103%, 104%, 105%, 106%, o al menos 107%, con respecto a un ensayo en blanco. El porcentaje de proteína solubilizada es determinado mediante el uso del modelo monogástrico *in vitro* del Ejemplo 3 y/o del Ejemplo 10. El término solubilización de proteínas significa básicamente el transporte de proteína(s) en la solución. Tal solubilización puede ser debida a una liberación mediada por proteasa de una proteína procedente de otros componentes de las composiciones naturales generalmente complejas como un producto alimentario.

En otra forma de realización particular, la proteasa para un uso según la invención es capaz de aumentar la cantidad de proteínas digeribles. A continuación se dan ejemplos de % de proteína digerida o digerible obtenible con el uso de las proteasas de la invención en un modelo monogástrico *in vitro*: Al menos 104%, 105%, 106%, 107%, 108%, 109%, 110%, 111%, 112%, 113%, 114%, 115%, o al menos 116%, con respecto a un ensayo en blanco. El porcentaje de proteína digerida o digerible es determinado mediante el uso del modelo *in vitro* del Ejemplo 3 y/o del Ejemplo 10.

A continuación se dan ejemplos de % de proteína digerida o digerible obtenible mediante el uso de las proteasas de la invención en un modelo *in vitro* de acuicultura: Al menos 103%, 104%, 105%, 106%, 107%, 108%, 109% o al menos 110%, con respecto a un blanco. El porcentaje de proteína digerida o digerible es determinado mediante el uso del modelo *in vitro* de acuicultura del Ejemplo 4.

En otra forma de realización particular también, la proteasa para un uso según la invención es capaz de incrementar el Grado de Hidrólisis (DH) de las proteínas. A continuación se dan ejemplos de aumento de grado de hidrólisis obtenible en un modelo monogástrico *in vitro*: De al menos 102%, 103%, 104%, 105%, 106%, o al menos 107%, con respecto a un ensayo en blanco. El DH es determinado usando el modelo monogástrico *in vitro* del Ejemplo 3. A continuación se dan ejemplos del aumento del Grado de Hidrólisis obtenible en un modelo *in vitro* de acuicultura: De al menos 102%, 103%, 104%, 105%, 106%, o al menos 107%, con respecto a un blanco. El DH es determinado usando el modelo *in vitro* de acuicultura del Ejemplo 4.

En una forma de realización particular de un procedimiento de (pre-) tratamiento de la invención, la(s) proteasa(s) en cuestión están afectando (o actuando sobre, o ejerciendo su influencia de solubilización sobre) las proteínas o fuentes de proteína. Para conseguir esto, la proteína o fuente de proteína es suspendida típicamente en un solvente, por ejemplo un solvente acuoso tal como el agua, y los valores de pH y de temperatura son ajustados en función de las características de la enzima en cuestión. Por ejemplo, el tratamiento puede realizarse con un valor de pH con el que la actividad de proteasa real es de al menos 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o de al menos 90%. Asimismo, por ejemplo, el tratamiento puede realizarse a una temperatura en la que la actividad de proteasa real sea de al menos 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o de al menos 90%. Las indicaciones de porcentaje de actividad anteriores son relativas a las actividades máximas. La reacción enzimática se continúa hasta obtener el resultado deseado, después de lo cual puede ser o no detenida por inactivación de la enzima, por ejemplo por una fase de tratamiento térmico.

En otra forma de realización particular de un proceso de tratamiento de la invención, la acción de la proteasa es sostenida, lo que indica por ejemplo, que la proteasa es añadida a las proteínas o fuentes de proteína, pero que su influencia de solubilización es tal que no se activa hasta más tarde cuando se desee, una vez que se han establecido las condiciones de solubilización adecuadas, o una vez que se ha inactivado cualquier inhibidor enzimático, o se podría aplicar cualquier otro medio para posponer la acción de la enzima.

En una forma de realización, el tratamiento es un pretratamiento para alimentos para animales o proteínas para un uso en los alimentos para animales.

Los términos mejorar el valor nutritivo de un alimento para animales significa mejorar la disponibilidad y/o digestibilidad de las proteínas, llevando de ese modo una mayor extracción de las proteínas de los componentes de las dietas, a mayores rendimientos de las proteínas, a una mayor degradación de las proteínas y/o a un uso mejor de las proteínas. El valor nutritivo del alimento es por lo tanto incrementado, y el rendimiento del animal como el índice de crecimiento y/o el aumento de peso y/o el ratio de conversión del alimento (es decir, el peso del alimento ingerido con respecto al aumento de peso) del animal es/son mejorados.

En una forma de realización particular la ratio de conversión del producto alimentario es aumentado en al menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% o al menos 10%. En otra forma de realización particular el aumento de peso es aumentado en al menos 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10% o al menos 11%. Estas cifras se refieren a experimentos de control sin adición de proteasas.

La ratio de conversión de alimentos (FCR) y el aumento de peso pueden ser calculados tal como se describe en EEC (1986): Directive de la Commission du 9 avril 1986 fixant la méthode de calcul de la valeur énergétique des aliments composés destinés à la volaille. Journal Officiel des Communautés Européennes, L130, 53 - 54.

La proteasa puede ser añadida al alimento en cualquier forma, en forma de una proteasa relativamente pura, o en forma de mezcla con otros componentes destinados a la adición en alimentos para animales, es decir en forma de aditivos de alimentos para animales, tales como las denominadas premezclas para alimentos para animales.

ES 2 315 666 T3

En otro aspecto la presente invención se refiere a composiciones para usar en los alimentos para animales, como los alimentos para animales y aditivos de alimentos para animales, por ejemplo premezclas.

5 Aparte de la proteasa de la invención, los aditivos de alimentos para animales de la invención contienen al menos una vitamina liposoluble, y/o al menos una vitamina hidrosoluble, y/o al menos un oligoelemento. El aditivo alimentario también puede contener al menos un macromineral.

10 Además, unos ingredientes opcionales aditivos en productos alimentarios son los agentes colorantes, por ejemplo carotenoides como beta-caroteno, astaxantina, y luteína; compuestos aromáticos; estabilizadores; péptidos antimicrobianos; ácidos grasos poliinsaturados; especies generadoras de oxígeno reactivo; y/o al menos otra enzima seleccionada entre las alfa-amilasa (EC 3.2.1.1), fitasa (EC 3.1.3.8 o 3.1.3.26); xilanas (EC 3.2.1.8); galactanasa (EC 3.2.1.89); alfa-galactosidasa (EC 3.2.1.22); proteasa (EC 3.4.-.-), fosfolipasa A1 (EC 3.1.1.32); fosfolipasa A2 (EC 3.1.1.4); lisofosfolipasa (EC 3.1.1.5); fosfolipasa C (3.1.4.3); fosfolipasa D (EC 3.1.4.4); amilasa tal como, por ejemplo, alfa-amilasa (EC 3.2.1.1); y/o beta-glucanasa (EC 3.2.1.4 o EC 3.2.1.6).

15 En una forma de realización particular estas otras enzimas son definidas correctamente (tal como han sido definidas anteriormente para las preparaciones de proteasas).

20 Unos ejemplos de péptidos antimicrobianos (AMP's) son CAP18, Leucocina A, Triterpticina, Protegrina-1, Tanatina, Defensina, Lactoferrina, Lactoferricina, y Ovispirina tal como Novispirina (Robert Lehrer, 2000), Plectasinas, y Estatinas, incluyendo los compuestos y polipéptidos descritos en WO 03/044049 y WO 03/048148, así como variantes o fragmentos de los anteriores que retengan actividad antimicrobiana.

25 Unos ejemplos de polipéptidos antifúngicos (AFP's) son el *Aspergillus giganteus*, y péptidos de *Aspergillus niger*, así como variantes y fragmentos de éstos que retengan actividad antifúngica, tal y como se describe en WO 94/01459 y WO 02/090384.

30 Unos ejemplos de ácidos grasos poliinsaturados son los ácidos grasos poliinsaturados C18, C20 y C22, como el ácido araquidónico, ácido docosohexaenoico, ácido eicosapentanoico y ácido gamma-linolénico.

35 Unos ejemplos de especies generadoras de oxígeno reactivo son productos químicos como el perborato, persulfato, o percarbonato; y enzimas como una oxidasa, una oxigenasa o un sintetasa.

40 Generalmente, las vitaminas hidrosolubles y liposolubles, así como los oligoelementos forman parte de una llamada premezcla destinada a ser añadida en el producto alimentario, mientras que los macrominerales son generalmente añadidos separadamente en el producto alimentario. Una premezcla enriquecida con una proteasa de la invención es un ejemplo de un aditivo de alimentos para animales de la invención.

45 En una forma de realización particular, el aditivo de alimentos para animales de la invención está destinado a ser incluido (o prescrito para ser incluido) en dietas o alimentos para animales en niveles del 0,01 al 10,0%; más particularmente del 0,05 al 5,0%; o 0,2 al 1,0% (el % indica los gramos de aditivo por 100 g de producto alimentario). Se realizan así, en particular, premezclas.

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

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

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

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

60 Ejemplos de macrominerales son el calcio, fósforo y sodio.

65 Los requisitos nutritivos de estos componentes (ejemplificados con aves de corral y lechones/cerdos) están anotados en la Tabla A de WO 01/58275. Los requisitos nutritivos significan que estos componentes deberían estar provistos en la dieta en las concentraciones indicadas.

Como alternativa, el aditivo de alimentos para animales de la invención comprende al menos uno de los componentes individuales específicos en la Tabla A de WO 01/58275. Al menos uno significa cualquiera de uno o más, uno, o dos, o tres, o cuatro, y así sucesivamente hasta los trece totales, o hasta los quince componentes individuales totales. Más específicamente, al menos este componente individual está incluido en el aditivo de la invención en una cantidad tal con el fin de proveer una concentración en el alimento situada en la gama indicada en la columna cuatro, o columna cinco, o columna seis de la Tabla A.

La presente invención se refiere también a composiciones de alimentos para animales. Las composiciones de alimentos o dietas para animales poseen un contenido de proteínas relativamente alto. Las dietas de las aves de corral

ES 2 315 666 T3

y de los cerdos pueden ser caracterizadas como está indicado en la Tabla B de WO 01/58275, columnas 2-3. Las dietas de los peces pueden ser caracterizadas como está indicado en la columna 4 de esta Tabla B. Además, estas dietas para peces presentan generalmente un contenido de grasa bruta de 200-310 g/kg. La patente WO 01/58275 corresponde a la patente US 09/779334 incorporadas en la presente como referencia.

5

Una composición de alimento para animales según la invención tiene un contenido de proteína bruta de 50-800 g/kg, y comprende también al menos una proteasa tal y como se reivindica aquí.

Además, o como alternativa (respecto al contenido de proteína bruta indicado más arriba), la composición del alimento para animales de la invención posee un contenido de energía metabolizable de 10-30 MJ/kg; y/o un contenido de calcio de 0,1-200 g/kg; y/o un contenido de fósforo disponible de 0,1-200 g/kg; y/o un contenido de metionina de 0,1-100 g/kg; y/o un contenido de metionina más cisteína de 0,1-150 g/kg; y/o un contenido de lisina de 0,5-50 g/kg.

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

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

La energía metabolizable puede ser calculada en base a la publicación sobre requisitos nutritivos NRC en cerdos, novena edición corregida 1988, subcomisión sobre la nutrición de cerdos, comité sobre nutrición animal, comité de agricultura, consejo de investigación nacional. National Academy Press, Washington, D.C., pp. 2-6, y la Tabla de Valores Energéticos para Alimentos para Aves de Corral, Spelderholt centre for poultry research and extension, 7361 DA Beekbergen, Países Bajos. Grafisch bedrijf Ponsen & looijen bv, Wageningen. ISBN 90-71463-12-5.

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

En una forma de realización particular, la composición de alimentos para animales de la invención contiene al menos una proteína o fuente de proteína tal y como se ha definido anteriormente. También puede contener proteína animal, tal como la harina de carne y de hueso, y/o harina de pescado, normalmente en una cantidad del 0-25%.

También en otras formas de realización particulares, la composición de alimentos para animales de la invención contiene 0-80% de maíz; y/o 0-80% de sorgo; y/o 0-70% de trigo; y/o 0-70% de cebada; y/o 0-30% de avena; y/o 0-40% de harina de soja; y/o 0-25% de harina de pescado; y/o 0-25% de harina de carne y de hueso; y/o 0-20% de lactosuero.

Los alimentos para animales pueden ser fabricados por ejemplo en forma de alimento triturado (no granulado) o alimento granulado. Normalmente, los productos alimentarios molidos son mezclados y unas cantidades suficientes de vitaminas esenciales y minerales son añadidas según las especificaciones para las especies en cuestión. Unas enzimas pueden ser añadidas en forma de formulaciones de enzimas sólidas o líquidas. Por ejemplo, una formulación de enzima sólida es añadida habitualmente antes de o durante la fase de mezcla; y una preparación enzimática líquida es añadida habitualmente después de la fase de granulación. La enzima también puede ser incorporada en un aditivo o premezcla para alimentos.

La concentración de enzima final en la dieta está en la gama de 0,01-200 mg de proteína enzimática por kg de dieta, por ejemplo en la gama de 0,5-25 mg de proteína enzimática por kg de dieta para animales.

La proteasa debería ser aplicada así en una cantidad eficaz, es decir en una cantidad adecuada para mejorar la solubilización y/o mejorar el valor nutritivo de la comida. Se considera actualmente que la enzima es administrada en una o más de las cantidades siguientes (gamas de dosificación): 0,01-200, 0,01-100, 0,5-100, 1-50, 5-100, 10-100, 0,05-50, o 0,10-10 - todas estas gamas presentándose en mg de proteína de enzima proteasa por kg de alimentos (ppm).

Para determinar los mg de proteína enzimática por kg de comida, la proteasa es purificada de la composición alimentaria, y la actividad específica de la proteasa purificada es determinada usando un ensayo relevante (véase en función de una actividad proteasa, sustratos, y ensayos). La actividad proteasa de la composición alimentaria como tal es determinada también por el mismo ensayo, y la dosificación en mg de proteína enzimática por kg de producto alimentario es calculada en base a estas dos determinaciones.

Se aplican los mismos principios para determinar los mg de proteína enzimática en aditivos alimentarios. Por supuesto, si se dispone de una muestra de la proteasa usada para preparar el aditivo alimentario o el producto alimentario, la actividad específica es determinada a partir de esta muestra (sin necesidad de purificar la proteasa de la composición alimentaria o del aditivo).

Composiciones para detergentes

La proteasa de la invención puede ser añadida y así convertirse en un componente de una composición para detergentes.

La composición para detergentes de la invención por ejemplo puede ser formulada como una composición para detergentes de lavado a mano o a máquina incluyendo una composición de aditivo adecuada para el pretratamiento de tejidos teñidos y una composición para suavizante de tejidos añadido durante el enjuague, o ser formulada como una composición para detergentes para un uso en operaciones de limpieza de superficie dura en hogares en general, o ser formuladas para operaciones de lavado de vajilla a mano o en lavavajillas.

En un aspecto específico, la invención provee un aditivo para detergentes comprendiendo la proteasa de la invención. El aditivo para detergentes así como la composición de detergentes puede comprender una u otras enzimas más como otra proteasa, proteasas alcalinas de *Bacillus*, una lipasa, una cutinasa, una amilasa, una carbohidrasa, una celulasas, una pectinasa, una mananasa, una arabinasa, una galactanasa, una xilanasa, una oxidasa, por ejemplo una lacasa, y/o una peroxidasa.

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

Las lipasas adecuadas incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Los mutantes de proteína creados genéticamente o modificados químicamente están incluidos. Ejemplos de lipasas útiles incluyen lipasas de *Humicola* (sinónimo de *Thermomyces*), por ejemplo de *H. lanuginosa* (*T. lanuginosus*) tal y como están descritas en EP 258068 y EP 305216 o de *H. insolens* tal y como están descritas en WO 96/13580, una lipasa de *Pseudomonas*, por ejemplo de *P. alcaligenes* o *P. pseudoalcaligenes* (EP 218272), *P. cepacia* (EP 331376), *P. stutzeri* (GB 1,372,034), *P. fluorescens*, especie *Pseudomonas*, cepa SD 705 (WO 95/06720 y WO 96/27002), *P. wisconsinensis* (WO 96/12012), una lipasa de *Bacillus*, por ejemplo de *B. subtilis* (Dartois *et al.* (1993), Biochemica et Biophysica Acta, 1131, 253-360), *B. stearothermophilus* (JP 64/744992) o *B. pumilus* (WO 91/16422). Otros ejemplos son variantes de lipasa tal y como están descritas en WO 92/05249, WO 94/01541, EP 407225, EP 260105, WO 95/35381, WO 96/00292, WO 95/30744, WO 94/25578, WO 95/14783, WO 95/22615, WO 97/04079 y WO 97/07202. Las enzimas de lipasa preferidas comercialmente disponibles incluyen Lipolase™ y Lipolase Ultra™ (Novozymes NS). Las amilasas adecuadas (alfa y/o beta) incluyen las que son de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen los mutantes de proteína creados genéticamente o modificados químicamente. Las amilasas incluyen, por ejemplo, alfa-amilasas obtenidas de *Bacillus*, por ejemplo una cepa especial de *B. licheniformis*, descrita más detalladamente en GB 1,296,839. Ejemplos de amilasas útiles son las variantes descritas en WO 94/02597, WO 94/18314, WO 95/26397, WO 96/23873, WO 97/43424, WO 00/60060, y WO 01/66712, especialmente las variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 15, 23, 105, 106, 124, 128, 133, 154, 156, 181, 188, 190, 197, 202, 208, 209, 243, 264, 304, 305, 391, 408, y 444. Las amilasas comercialmente disponibles son Natalase™, Supramyl™, Stainzyme™, Duramyl™, Termamyl™, Fungamyl™ y BAN™ (Novozymes NS), Rapidase™ y Purastar™ (de Genecor International Inc.).

Las células adecuadas incluyen las que son de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen los mutantes de proteína creados genéticamente o modificados químicamente. Las celulasas adecuadas incluyen celulasas del género *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, por ejemplo las celulasas fúngicas producidas a partir de *Humicola insolens*, *Myceliophthora thermophila* y *Fusarium oxysporum* descritas en US 4,435,307, 5,648,263, 5,691,178, 5,776,757 y WO 89/09259. Las celulasas especialmente adecuadas son las celulasas alcalinas o neutras que poseen beneficios para el cuidado del color. Ejemplos de tales celulasas son las celulasas descritas en EP 0 495257, EP 531372, WO 96/11262, WO 96/29397, WO 98/08940. Otros ejemplos son variantes de celulasas como las que están descritas en WO 94/07998, EP 0 531 315, 5,457,046, 5,686,593, 5,763,254, WO 95/24471, WO 98/12307 y WO 99/01544. Las celulasas comercialmente disponibles incluyen Celluzyme™, y Carezyme™ (Novozymes NS), Clazinase™, y Puradax HA™ (Genecor International Inc.), y KAC- 500(B)™ (Kao Corporation).

Las peroxidasas/oxidases adecuadas incluyen las que son de origen vegetal, bacteriano o fúngico. Se incluyen los mutantes de proteína creados genéticamente o modificados químicamente. Ejemplos de peroxidasas útiles incluyen peroxidasas de *Coprinus*, p. ejemplo de *C. cinereus*, y variantes de éstas como las que están descritas en WO 93/24618, WO 95/10602, y WO 98/15257. Las peroxidasas comercialmente disponibles incluyen Guardzyme™ (Novozymes).

La(s) enzima(s) de detergente puede(n) ser incluida(s) en una composición de detergente mediante la adición de aditivos separados conteniendo una o más enzimas, o por adición de un aditivo combinado comprendiendo todas estas enzimas. Un aditivo para detergentes de la invención, es decir un aditivo separado o un aditivo combinado, puede estar formulado por ejemplo como un granulado, un líquido, un gel, etc. Las formulaciones preferidas de aditivo para detergentes son los granulados, en particular granulados no pulverulentos, líquidos, en particular líquidos estabilizados, o geles.

Los granulados no pulverulentos pueden ser producidos, por ejemplo, tal y como está descrito en US 4,106,991 y 4,661,452 y pueden ser revestidos opcionalmente mediante métodos conocidos en la técnica. Unos ejemplos de materiales de revestimiento cerosos son los productos de óxido de poli(etileno), (polietilenoglicol, PEG) con pesos

ES 2 315 666 T3

molares medios de 1000 a 20000; nonilfenoles etoxilados que poseen 16 a 50 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos etoxilados en los que el alcohol contiene de 12 a 20 átomos de carbono y donde se encuentran 15 a 80 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos; ácidos grasos; y mono- y di- y triglicéridos de ácidos grasos. En GB 1483591 se proveen ejemplos de materiales de revestimiento para la formación de películas adecuadas para la aplicación mediante técnicas de lecho fluidizado. Las preparaciones enzimáticas líquidas pueden, por ejemplo, ser estabilizadas mediante la adición de un poliol como el propilenglicol, azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico o ácido bórico según métodos establecidos. Unas enzimas protegidas pueden ser preparadas según el método descrito en EP 238216.

10 La composición de detergente de la invención puede ser de cualquier forma apropiada, por ejemplo, una barra, una pastilla, un polvo, un gránulo, una pasta o un líquido. Un detergente líquido puede ser acuoso, conteniendo generalmente hasta 70% de agua y 0-30% de solvente orgánico, o no acuoso.

15 La composición de detergente comprende uno o más agentes tensioactivos, que pueden ser no iónicos incluyendo semipolares y/o aniónicos y/o catiónicos y/o zwitteriónicos. Los agentes tensioactivos están presentes en general en un nivel del 0,1% al 60% en peso.

20 Cuando está incluido dentro, el detergente contendrá en general desde aproximadamente 1% hasta aproximadamente 40% de agente tensioactivo aniónico tal como un alquilbencenosulfonato lineal, alfa-olefinsulfonato, sulfato de alquilo (sulfato de alcohol graso), etoxisulfato de alcohol, alcanosulfonato secundario, éster metílico de ácido alfa-sulfo graso, ácido alquilo o alquenilsuccínico o jabón.

25 Cuando está incluido dentro, el detergente contiene en general desde aproximadamente 0,2% hasta aproximadamente 40% de agente tensioactivo no-iónico tal como un alcohol etoxilado, nonilfenol, etoxilato alquilpoliglicósido, óxido de alquildimetilamina, monoetanolamida de ácido graso etoxilado, monoetanolamida de ácido graso, polihidroxialquilamidas de ácido graso, o derivados N-acilo N-alquilo de glucosamina ("glucamidas").

30 El detergente puede contener 0-65% de un constructor de detergente o agente complejante tal como zeolita, difosfato, trifosfato, fosfonato, carbonato, citrato, ácido nitrilotriacético, ácido etilendiaminatetraacético, ácido dietileno-triaminopentaacético, ácido alquilo o alquenilsuccínico, silicatos solubles o silicatos estratificados (por ejemplo SKS-6 de Hoechst).

35 El detergente puede comprender uno o más polímeros. Unos ejemplos son carboximetilcelulosa, poli(vinilpirrolidona), poli(etilenoglicol), poli(vinil alcohol), poli(vinilpiridina-N-óxido), poli(vinilimidazol), policarboxilatos como poliacrilatos, copolímeros de ácido maléico/acrílico y copolímeros de lauril metacrilato/ácido acrílico.

40 El detergente puede contener un sistema blanqueante que puede comprender una fuente de H₂O₂ como el perborato o percarbonato que puede estar combinado con un activador blanqueador de formación de perácidos como tetraacetiltilenodiamina o nonanoiloxibencenosulfonato. De forma alternativa, el sistema blanqueante puede comprender peroxiácidos por ejemplo de amida, imida, o de un tipo de sulfona.

45 La(s) enzima(s) de la composición de detergente de la invención puede(n) ser estabilizada(s) usando agentes convencionales estabilizantes, por ejemplo un poliol como el propilenglicol o glicerol, azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico, ácido bórico, o un derivado de ácido bórico, por ejemplo éster de borato aromático, o un derivado de ácido fenil borónico como el ácido 4-formilfenil borónico, y la composición puede estar formulada tal y como está descrito, por ejemplo en WO 92/19709 y WO 92/19708.

50 El detergente puede contener también otros ingredientes de detergentes convencionales como por ejemplo acondicionadores para tejidos incluyendo arcillas, reforzadores de espuma, supresores de espuma, agentes anticorrosivos, agentes de suspensión de suciedad, agentes de antiposo de suciedad, tintes, bactericidas, blanqueadores ópticos, hidrotropos, inhibidores de decoloración, o perfumes.

55 Se considera actualmente que en las composiciones de detergentes, cualquier enzima, en particular la enzima de la invención, puede ser añadida en una cantidad correspondiente a 0,01-100 mg de proteína enzimática por litro de detergente, preferiblemente 0,05-5 mg de proteína enzimática por litro detergente, en particular 0,1-1 mg de proteína enzimática por litro de detergente.

60 La enzima de la invención puede estar incorporada también en las formulaciones para detergentes descritas en WO 97/07202.

Depósito de material biológico

65 Los siguientes materiales biológicos han sido depositados según las condiciones del tratado de Budapest con el DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Alemania), y con los siguientes números de registro:

ES 2 315 666 T3

Depósito	Número de registro	Fecha de depósito
<i>Nocardiosis alba</i>	DSM 15647	30 de mayo de 2003
<i>Nocardiosis especie</i>	DSM 16424	24 de mayo de 2004

5

10 Estas cepas han sido depositadas en unas condiciones que aseguran que el acceso al cultivo estará disponible durante el trámite de esta solicitud de patente a quien sea designado por el Comisario de Patentes y Marcas Registradas que debe aparecer en los párrafos 37 C.F.R. §1.14 y 35 U.S.C. §122. El depósito representa un cultivo esencialmente puro de la cepa depositada. El depósito está disponible según lo requerido por las leyes de patentes extranjeras en aquellos países donde las contrapartidas de la solicitud expuesta, o de su progenie estén depositados. No obstante, se entenderá que la disponibilidad de un depósito no constituye una licencia para poner en práctica la invención expuesta en la derogación de derechos de patentes concedidas por medio de una acción gubernamental.

15

Nocardiosis dassonvillei, subespecie *dassonvillei* DSM 43235 está disponible al público por DSMZ. También se depositó en otras instituciones depositarias tales como las siguientes: ATCC 23219, IMRU 1250, NCTC 10489.

20

La invención descrita y reivindicada aquí no debe ser limitada en su ámbito por las formas de realización específicas descritas aquí, ya que estas formas de realización están previstas como ilustraciones de varios aspectos de la invención. Cualquiera de las formas de realización equivalentes está destinadas a formar parte del campo de esta invención. En efecto, de la descripción precedente los expertos en la materia deducirán varias modificaciones de la invención además de las que están mostradas y descritas aquí. Tales modificaciones también están previstas como una parte del ámbito de las reivindicaciones anexas. En caso de conflicto se tendrá en cuenta la descripción presente incluyendo las definiciones.

25

Varias referencias son citadas aquí, cuyas descripciones han sido incorporadas completas como referencia.

30

Ejemplos

Ejemplo 1

35

Clonación y expresión de la proteasa de Nocardiosis dassonvillei, subespecie dassonvillei DSM 43235

Reactivos y medios

40

LB agar Descrito en Ausubel, F. M. *et al.* (eds.) "Current protocols in Molecular Biology". John Wiley and Sons, 1995

LB-PG agar LB agar con suplemento del 0,5% de Glucosa y 0,05 M de fosfato de potasio, pH 7,0

45

PS-1 10% de sacarosa, 4% de harina de soja, 1% Na₃PO₄-12H₂O, 0,5% de CaCO₃, y 0,01% de ácido plurónico

TE 10 mM Tris-HCl, pH 7,4

1 mM EDTA,

50

pH 8,0

TEL 50 mg/ml de Lisozima en tampón TE

Tiocianato 5M de tiocianato de guanidinio 100 mM de EDTA

55

0,6% en p/v de N-laurilsarcosina, sal de sodio

60

60 g de tiocianato, 20 ml 0,5 M de EDTA, pH 8,0, 20 ml de H₂O se disuelve a 65°C. Temperatura de enfriamiento a temperatura ambiente (RT) y adición de 0,6 g de N-laurilsarcosina. Adición de H₂O en 100 ml y filtrado de éste a través de un filtro estéril de 0,2 µ.

NH₄Ac 7,5 M de CH₃COONH₄

TER 1 µg/ml Rnase A en tampón TE

65

CIA Cloroformo/alcohol isoamilico 24:1

ES 2 315 666 T3

Procedimiento experimental

La SEC ID N°: 1 es la secuencia de ADN de codificación de una proforma de la proteasa *Nocardiopsis dassonvillei*, subespecie *dassonvillei* DSM 43235. Los nucleótidos 499-1062 corresponden a la parte de codificación del péptido maduro.

La SEC ID N°: 2 es la secuencia de aminoácidos deducida de la SEC ID N°: 1. Los aminoácidos -166 a -1 son el propéptido, y los aminoácidos 1 a 188 el péptido maduro.

10 Clonación de SEC ID N°: 1

El tipo salvaje fue cultivado durante 3 días antes de la recogida en el medio siguiente a 30°C:

15	Trypticasa	20 g
	Extracto de levadura	5 g
20	Ferrocianuro	6 mg
	Sulfato de magnesio Agua	5 mg
	destilada hasta	1000 ml
25	<hr/> El pH fue ajustado a 7,2 por adición de hidróxido de sodio <hr/>	

30 El ADN genómico de *Nocardiopsis dassonvillei*, subespecie *dassonvillei* DSM 43235 fue aislado según el procedimiento siguiente:

1. Recogida de 1,5 ml de cultivo y resuspensión en 100 μ l de TEL. Incubación a 37°C durante 30 min.
- 35 2. Adición de 500 μ l de tampón de tiocinato y disposición a temperatura ambiente durante 10 min.
3. Adición de 250 μ l de NH₄Ac y disposición en hielo durante 10 min.
4. Adición de 500 μ l de CIA y mezcla.
- 40 5. Transferencia en una microcentrifugadora y centrifugado durante 10 min. a máxima velocidad.
6. Transferencia de sobrenadante a un tubo de Eppendorf nuevo y adición de 0,54 de isopropanol frío por volumen. Mezcla rigurosa.
- 45 7. Centrifugado y lavado del granulado de ADN con 70% de EtOH.
8. Resuspensión del ADN genómico en 100 μ l de TER.

50 El ADN genómico fue usado como molde para una amplificación por PCR mediante el uso de iniciadores de SEC ID N°: 3 y 4. El fragmento de PCR fue aislado en 0,7% de gel de agarosa y digerido con enzimas de restricción Cla I y BamH I. El iniciador 1565 (SEC ID N°: 4) afecta a un sitio BamH I cambiando un codón de arginina de CGG a AGA e introduce un nuevo sitio BamH I hacia abajo desde el codón de detención.

55 Iniciadores

1423: 5'-GCT TTT AGT TCA TCG ATC GCA TCG GCT GCT CCG GCC CCC GTC CCC CAG-3' (SEC ID N°: 3)

1565: 5'- GCG GAT CCT ATT AGG TTC TGA TCC TGA CAC CCC AG-3' (SEC ID N°: 4)

60 El fragmento de PCR digerido y purificado fue ligado al plásmido digerido Cla I y BamH I pDG268NeoMCS-PrmyQ/PrcryIII/cryIIIAstab/Sav (Patente EEUU: 5,955,310).

La mezcla de ligación fue usada para una transformación en *E. coli* TOP10F' (Invitrogen BV, Países Bajos) y varias colonias fueron seleccionadas para una minipreparación (centrifugado QIAprep, QIAGEN GmbH, Alemania). Los plásmidos purificados fueron controlados para su inserción antes de la transformación en una cepa de *Bacillus subtilis* derivada de *B. subtilis* DN 1885 con genes rotos apr npr y pel (Diderichsen *et al* (1990), J. Bacterol., 172, 4315-4321). La ruptura fue realizada esencialmente tal y como se ha descrito en "Bacillus subtilis and other Gram-

ES 2 315 666 T3

Positive Bacteria,” American Society for Microbiology, p.618, eds. A.L. Sonenshein, J.A. Hoch and Richard Losick (1993). Las células transformadas fueron depositadas en placas en 1% de leche desnatada de placas agar LB-PG, con un suplemento de 6 µg/ml de cloranfenicol. Las células depositadas en placas fueron incubadas toda una noche a 37°C y unas colonias conteniendo proteasas fueron identificadas por una zona de clarificación circundante. Las colonias positivas de proteasas fueron seleccionadas y la secuencia codificante de la enzima expresada a partir del constructo de expresión fue confirmado por análisis de secuencia de ADN.

Fermentación

La célula huésped de *Bacillus subtilis* transformada tal y como se ha descrito anteriormente fue fermentada en una mesa de agitación giratoria (250 r.p.m.) en 500 ml en frascos Erlenmeyer con deflector conteniendo 100 ml de medio PS-1 con un suplemento de 6 µg/ml de cloranfenicol, a 37°C durante 16 horas y a 26°C durante 4 días más.

Ejemplo 2

Purificación y caracterización de la proteasa *Nocardioopsis dassonvillei*, subespecie *dassonvillei* DSM 43235

Ensayos de proteasa

1) Ensayo de pNA:

Sustrato de pNA: Suc-AAPF-pNA (Bachem L-1400).

Temperatura: Temperatura ambiente (25°C)

Tampones de ensayo: 100 mM de ácido succínico, 100 mM de HEPES, 100 mM de CHES, 100 mM de CABS, 1 mM de CaCl₂, 150 mM de KCl, 0,01% de Tritón X-100 ajustados a valores de pH 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0, 11,0 y 12,0 con HCl o NaOH.

Se mezclan 20 µl de proteasa (diluida en 0,01% de Tritón X-100) con 100 µl de tampón de ensayo. El ensayo es iniciado mediante la adición de 100 µl de sustrato de pNA (50 mg disueltos en 1,0 ml de DMSO y diluidos después 45 x con 0,01% de Tritón X-100). El aumento en OD₄₀₅ es vigilado como una medida de la actividad proteasa.

2) Ensayo de Protazyme AK:

Sustrato: comprimidos Protazyme AK (caseína reticulada y teñida; de Megazyme)

Temperatura: controlada (temperatura de ensayo).

Tampones de ensayo: 100 mM de ácido succínico, 100 mM de HEPES, 100 mM de CHES, 100 mM de CABS, 1 mM de CaCl₂, 150 mM de KCl, 0,01% de Tritón X-100 ajustados a valores de pH 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0 y 11,0 con HCl o NaOH.

Un comprimido Protazyme AK es suspendido en 2,0 ml de 0,01% de Tritón X-100 mediante una agitación suave. 500 µl de esta suspensión y 500 µl de tampón de ensayo son mezclados en un tubo Eppendorf y colocados en hielo. Se añaden 20 µl de muestra de proteasa (diluidos en 0,01% de Tritón X-100). El ensayo es iniciado por transferencia del tubo Eppendorf a un termomezclador Eppendorf, que se ajusta a la temperatura de ensayo. El tubo es incubado durante 15 minutos en el termomezclador Eppendorf a su máxima velocidad de agitación (1400 rpm). La incubación es detenida por transferencia del tubo de vuelta al baño de hielo. El tubo es centrifugado después en un centrifugador de congelación durante unos minutos y 200 µl de sobrenadante es transferido a una placa de microtitulación. OD₆₅₀ es leída como una medida de la actividad proteasa. Un tampón ciego es incluido en el ensayo (en vez de la enzima).

Procedimiento experimental

La fermentación de proteasa descrita en el ejemplo 1 fue centrifugada (20000 x g, 20 min) y los sobrenadantes fueron decantados cuidadosamente de los precipitados. Los sobrenadantes combinados fueron filtrados a través de una placa Seitz EKS para eliminar el resto de las células huéspedes de *Bacillus*. El filtrado EKS fue transferido a 50 mM de H₃BO₃, 5 mM de ácido succínico, 1 mM de CaCl₂, pH 7 en una columna Sephadex G25 y aplicado a una columna de bacitracina sílica equilibrada en el mismo tampón. Después de un lavado extensivo de la columna con el tampón de equilibrado, la proteasa fue eluida por fase con 100 mM de H₃BO₃, 10 mM de ácido succínico, 2 mM de CaCl₂, 1 M de NaCl, 25% de isopropanol, pH 7. El eluato de bacitracina fue transferido a 50 mM de H₃BO₃, 10 mM de CH₃COOH, 1 mM de CaCl₂, pH 4,5 y aplicado a una columna S de Sefarosa HP equilibrada en el mismo tampón. Después de un lavado extensivo de la columna con el tampón de equilibrado, la proteasa fue eluida con un gradiente de NaCl lineal (0 --> 0,5M) en el mismo tampón. Fracciones de la columna fueron analizadas para determinar la actividad proteasa (usando el ensayo con Protazyme AK a 37°C y pH 9) y unas fracciones activas fueron analizadas también por SDS-PAGE. Las fracciones donde sólo una banda era vista en el gel de SDS-PAGE teñido con Coomassie fueron agrupadas en forma de preparación purificada y usadas para otra caracterización.

ES 2 315 666 T3

Actividad según pH, estabilidad según pH, y actividad según temperatura

Se usó el ensayo con pNA para obtener el perfil de actividad en función del pH así como el perfil de estabilidad en función del pH. Para el perfil de estabilidad según el pH la proteasa fue diluida 10x en los tampones de ensayo e incubada durante 2 horas a 37°C. Después de la incubación las muestras de proteasa fueron transferidas con el mismo pH - pH 9, antes del ensayo para determinar la actividad residual, por dilución en el tampón de ensayo de pH 9. Se usó el ensayo con Protazyme AK para obtener el perfil de actividad según la temperatura a un pH 9. Los resultados aparecen en las Tablas 1-3 más abajo.

TABLA 1

Perfil de actividad en función del pH

pH	Proteasa derivada de <i>Nocardioopsis dassonvillei</i> , subespecie <i>dassonvillei</i> DSM 43235	Protasa derivada de la especie <i>Nocardioopsis</i> , NRRL 18262
2	0,00	-
3	0,00	0,00
4	0,03	0,02
5	0,11	0,07
6	0,21	0,21
7	0,37	0,44
8	0,71	0,67
9	0,97	0,88
10	1,00	1,00
11	0,94	0,93

TABLA 2

Perfil de estabilidad según pH

pH	Proteasa derivada de <i>Nocardioopsis dassonvillei</i> , subespecie <i>dassonvillei</i> DSM 43235	Protasa derivada de la especie <i>Nocardioopsis</i> , NRRL 18262
2,0	1,00	0,78
2,5	0,95	1,00
3,0	0,97	1,03
3,5	1,01	0,98
4,0	0,98	0,99
5,0	0,97	1,02
6,0	0,98	1,00
7,0	0,96	1,01
8,0	0,99	0,98
9,0	0,99	0,99
10,0	0,96	0,99
11,0	0,94	0,86
12,0	0,84	-
9,0 y después de 2 horas a 5 °C	1,00	1,00

TABLA 3

Perfil de actividad según temperatura

Temperatura (°C)	Proteasa derivada de <i>Nocardiopsis dassonvillei</i> , subespecie <i>dassonvillei</i> DSM 43235	Protasa derivada de la especie <i>Nocardiopsis</i> , NRRL 18262
15	0,08	0,02
25	0,01	0,02
37	0,03	0,07
50	0,09	0,20
60	0,19	0,51
70	0,63	1,00
80	1,00	0,39
90	0,35	-

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se usó la DSC para determinar la estabilidad de la temperatura con un pH 7,0 de las proteasas derivadas de *Nocardiopsis dassonvillei*, subespecie *dassonvillei* DSM 43235 y de la especie *Nocardiopsis*, NRRL 18262. Las proteasas purificadas fueron dializadas toda la noche a 4°C en 10 mM de fosfato sódico, 50 mM de cloruro sódico, pH 7,0 y pasaron sobre un instrumento de VP-DSC (Microcalometría) con un índice de barrido constante de 1,5°C/min de 20 a 100°C. El tratamiento de datos se realizó usando el software original de Microcalometría.

Las temperaturas de desnaturalización o de fusión resultantes, T_m , eran: Para la proteasa de la invención derivada de *Nocardiopsis dassonvillei*, subespecie *dassonvillei* de: 83,0°C; para la proteasa derivada de la especie de *Nocardiopsis*, NRRL 18262 de: 76,5°C.

Otras características

Se comprobó que la proteasa era inhibida por metil fenil sulfonil fluoruro. Su peso molecular relativo determinado por SDS-PAGE era $M_r = 20$ kDa, y la secuencia N-terminal: ADIIGGLAYYMGGRC.

Ejemplo 3

Rendimiento de la proteasa de Nocardiopsis dassonvillei, subespecie dassonvillei DSM 43235 en un modelo de digestión in vitro monogástrico

El rendimiento de una preparación purificada de la parte madura de la proteasa que posee una SEC ID N°: 2 (preparada tal y como está descrita en los Ejemplos 1 y 2) fue probado en un modelo *in vitro* simulando la digestión en animales monogástricos. En particular, se evaluó la proteasa con respecto a su capacidad para mejorar la solubilización y la digestión de proteínas de maíz/SBM (harinas a base de maíz/soja). En las tablas más abajo, esta proteasa es designada "proteasa de la invención". El sistema *in vitro* consistía en 15 frascos donde el sustrato de maíz/SBM era incubado inicialmente con HCl/pepsina - simulando una digestión gástrica - y posteriormente con pancreatina - simulando una digestión intestinal. 10 de los frascos fueron dosificados con la proteasa al principio de la fase gástrica mientras que los frascos restantes servían de blancos. Al final de la fase de incubación intestinal las muestras de digestión *in vitro* fueron eliminadas y analizadas para determinar la proteína solubilizada y digerida.

ES 2 315 666 T3

Resumen del procedimiento de digestión in vitro

Componentes añadidos	pH	Temperatura	Curso temporal	Fase de digestión simulada
10 g de sustrato de maíz/SBM (6:4), 41 ml de HCl (0,105M)	3,0	40°C	t=0 min	Mezcla
5 ml de HCl (0,105M)/ pepsina (3000 U/g de sustrato), 1 ml de proteasa de la invención	3,0	40°C	t=30 min	Digestión gástrica
16 ml H ₂ O	3,0	40°C	t= 1,0 hora	Digestión gástrica
7 ml de NaOH (0,39M)	6,8	40°C	t=1,5 horas	Digestión intestinal
5 ml de NaHCO ₃ (1 M) / pancreatina (8 mg/g por dieta)	6,8	40°C	t=2,0 horas	Digestión intestinal
Incubación final	7,0	40°C	t=6,0 horas	

Condiciones

Sustrato: 4 g de SBM, 6 g de maíz (premezclado)

pH: 3,0 en fase de estómago/6,8-7,0 en fase intestinal

HCl: 0,105 M durante 1,5 horas (es decir, premezcla de HCl-sustrato durante 30 min)

pepsina: 3000 U/g por dieta durante 1 hora

pancreatina: 8 mg/g por dieta durante 4 horas

temperatura: 40°C.

Replicados: 5

Soluciones

0,39 M de NaOH

0,105 M de HCl

0,105 M de HCl conteniendo 6000 U de pepsina por 5 ml

1 M de NaHCO₃ conteniendo 16 mg de pancreatina por ml

125 mM de tampón NaAc, pH 6,0

ES 2 315 666 T3

Determinaciones de proteína enzimática

La cantidad de proteína de enzima proteásica (a continuación proteína enzimática abreviada EP) es calculada en base a los valores A_{280} y a las secuencias de aminoácidos (composiciones de aminoácidos) usando los principios resumidos en S.C. Gill & P.H. von Hippel, *Analytical Biochemistry* 182, 319-326. (1989).

Procedimiento experimental para modelo in vitro

El procedimiento experimental se definió según el perfil mencionado anteriormente. El pH se midió en periodos de 1, 2,5, y 5,5 horas. Se terminaron las incubaciones después de 6 horas y se retiraron muestras de 30 ml y se dispusieron en hielo antes del centrifugado (10000 X g, 10 min, 4°C). Los sobrenadantes fueron retirados y almacenados a -20°C.

15 *Análisis*

Se analizó el grado en % de proteína de todas las muestras con el método OPA así como el contenido de proteína solubilizada y digerida mediante el uso de una filtración en gel.

20 *Determinación de DH por el método OPA*

El grado de hidrólisis (OH) de proteína en distintas muestras fue determinado usando una placa de microtitulación semiautomatizada basada en un método calorimétrico (Nielsen, P.M.; Petersen, D.; Dambmann, C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *J. Food Sci.* 2001, 66, 642-646). El agente reactivo de OPA fue preparado como se indica a continuación: 7.620 g de di-Na tetraborato decahidrato y 200 mg de dodecil sulfato de sodio (SDS) fueron disueltos en 150 ml de agua desionizada. Los agentes reactivos fueron disueltos completamente antes de continuar. Se disolvieron 160 mg de o-ftaldialdehído al 97% (OPA) en 4 ml de etanol. La solución de OPA fue transferida cuantitativamente a la solución mencionada anteriormente mediante un aclarado con agua desionizada. Se añadieron 176 mg de ditiotreitól al 99% (DTT) a la solución que fue preparada con 200 ml de agua desionizada. Una serina estándar (0.9516 meqv/l) fue preparada por solubilización de 50 mg de serina (Merck, Alemania) en 500 ml de agua desionizada.

La solución de muestra fue preparada mediante la dilución de cada muestra hasta una absorbencia (280 nm) de aproximadamente 0,5. Generalmente, los sobrenadantes eran diluidos (100 x) usando una estación automatizada de dilución Tecan (Männedorf, Suiza). Todas las otras lecturas del espectrofotómetro fueron realizadas a 340 nm usando agua desionizada como control. Se dispensaron 25 μ l de muestra, estándar y ciega en una placa de microtitulación. La placa de microtitulación fue insertada en un lector iEM MF (Labsystems, Finlandia) y 200 μ l de agente reactivo de OPA fue proporcionado automáticamente. Las placas fueron agitadas (2 min; 700 rpm) antes de medir la absorbencia. Finalmente, se calculó el DH. Se efectuó la determinación óptuple de todas las muestras.

Estimación de proteínas solubilizadas y digeridas

El contenido de proteína solubilizada en los sobrenadantes de las muestras digeridas *in vitro* fue determinado por cuantificación de la proteína bruta (CP) usando una filtración en gel HPLC. Los sobrenadantes fueron descongelados, filtrados a través de filtros de 0,45 μ m de policarbonato y diluidos (1:50, v/v) con H₂O. Las muestras diluidas fueron cromatografiadas por HPLC usando una columna de filtración en gel (Global) de péptido Superdex PE (7,5 x 300 mM). El eluyente usado para la elución isocrática fue de 50 mM de tampón de fosfato de sodio (pH 7,0) conteniendo 150 mM de NaCl. El volumen total de eluyente por operación fue 26 ml y el caudal de 0,4 ml/min. Los perfiles de elución fueron registrados a 214 nm y el área total bajo los perfiles eran determinados por integración. Para estimar el contenido de proteína a partir de las áreas integradas, se estableció una curva de calibrado ($R^2=0,9993$) a partir de una serie de dilución de una muestra de maíz/SBM de referencia digerida *in vitro* con un contenido de proteínas totales conocido. La determinación de proteínas en esta muestra de referencia se efectuó usando el método Kjeldahl (determinación de % de nitrógeno; Official Methods of Analysis 14th ed., Washington DC).

El contenido de proteína digerida fue determinado mediante la integración del área de cromatograma correspondiendo a péptidos y aminoácidos con una masa molecular de 1500 dalton o menos (Savoie, L.; Gauthier, S.F. Dialysis Cell For The *In-vitro* Measurement Of Protein Digestibility. *J. Food Sci.* 1986, 51, 494-498; Babinszky, L.; Van, D.M.J.M.; Boer, H.; Den, H.L.A. An *In-vitro* Method for Prediction of The Digestible Crude Protein Content in Pig Feeds. *J. Sci. Food Agr.* 1990, 50, 173-178; Boisen, S.; Eggum, B.O. Critical Evaluation of *In-vitro* Methods for Estimating Digestibility in Simple-Stomach Animals. *Nutrition Research Reviews* 1991, 4, 141-162). Para determinar la línea de división de 1500 dalton, la columna de filtración en gel se calibró usando citocromo C, (Boehringer, Alemania), aprotinina, gastrina I, y sustancia P (Sigma Aldrich, EEUU), como estándares de masa molecular.

ES 2 315 666 T3

Resultados

Los resultados mostrados en las Tablas 4 y 5 más abajo indican que la proteasa aumentaba el grado de hidrólisis (DH), así como la proteína soluble y digerible de forma significativa.

TABLA 4

Grado de hidrólisis (DH), valores absolutos y relativos							
Enzima (dosificación en mg de EP/kg de comida)	n	De proteína total			Relativa al blanco		
		%DH		SD	%DH		%CV
Blanco	5	26,84	a	0,69	100,0	a	2,57
Proteasa de la invención (100)	5	28,21	b	0,35	105,1	b	1,25

Distintas letras en la misma columna indican diferencias importantes (análisis de la varianza de un factor, prueba de Tukey-Kramer, $P < 0.05$). SD = desviación estándar. %CV = Coeficiente de varianza = (valor SD/medio) x 100%

TABLA 5

Proteína cruda solubilizada y digerida medida por HPLC ÄKTA..													
Enzima (dosificación en mg de EP/kg alimentado)	n	De proteína total						Relativa al blanco					
		%dig. CP	SD	%sol. CP	SD	%dig. CP	CV%	%sol. CP	CV %				
Blanco	5	54,1	a	1,1	90,1	a	1,1	100,0	a	2,0	100,0	a	1,2
Proteasa de la invención (50)	5	57,7	b	1,1	93,2	b	1,4	106,7	b	1,9	103,4	b	1,5
(100)	5	58,9	b	0,8	94,8	b	0,9	108,9	b	1,3	105,2	b	0,9

Distintas letras en la misma columna indican diferencias importantes (Análisis de la varianza de un factor, prueba de Tukey-Kramer, $P < 0,05$). SD = Desviación estándar. %CV = Coeficiente de varianza = (valor SD/medio) X 100%

ES 2 315 666 T3

Ejemplo 4

Rendimiento de la proteasa de Nocardiopsis dassonvillei subespecie dassonvillei DSM 43235 en un modelo de acuicultura in vitro

La preparación de proteasa tal y como está descrita en el ejemplo 3 fue evaluada en un modelo de acuicultura *in vitro* simulando la digestión de un pez en agua fría. El sistema *in vitro* consistía en 15 frascos donde el sustrato SBM era incubado inicialmente con HCl/pepsina - simulando una digestión gástrica - y posteriormente con pancreatina - simulando una digestión intestinal. Se dosificaron 10 de los frascos con la proteasa al principio de la fase gástrica mientras que los 5 frascos restantes servían de blancos. Al final de la fase de incubación intestinal, las muestras de digestión *in vitro* fueron eliminadas y analizadas para determinar la proteína solubilizada y digerida.

Resumen del procedimiento de digestión en agua in vitro

Componentes añadidos	pH	Temperatura	Curso temporal	Fase de digestión simulada
10 g de sustrato SBM extrudido, 62 ml de HCl (0,155M)/pepsina (4000 de sustrato de u/g), 1 mL de la proteasa de la invención	3,0	15°C	t=0 min	Digestión gástrica
7 ml de NaOH (1.1M)	6,8	15°C	t=6 horas	Digestión intestinal
5 ml de NaHCO ₃ (1 M)/ pancreatina (8 mg/g dieta)	6,8	15°C	t=7 horas	Digestión intestinal
Incubación terminada	7,0	15°C	t=24 horas	

Condiciones

Sustrato: 10 g de SBM extrudido
 pH: 3,0 en fase estomacal/6,8-7,0 en fase intestinal
 HCl: 0,155 M durante 6 horas
 Pepsina: 4000 U/g por dieta durante 6 horas
 Pancreatina: 8 mg/g por dieta durante 17 horas
 Temperatura: 15°C
 Replicados: 5

Soluciones

1,1 M de NaOH
 0,155 M de HCl/pepsina (4000 u/g por comida)
 1 M de NaHCO₃ conteniendo 16 mg de pancreatina/ml
 125 mM de tampón NaAc, pH 6.0

ES 2 315 666 T3

Procedimiento experimental para un modelo in vitro en agua

El producto experimental fue formado según el resumen indicado más arriba. El pH fue medido en periodos de 1, 5, 8 y 23 horas. Las incubaciones se terminaron después de 24 horas y unas muestras de 30 ml fueron retiradas y colocadas en hielo antes del centrifugado (13000 x g, 10 min, 0°C). Los sobrenadantes fueron retirados y almacenados a -20°C.

Análisis

Todos los sobrenadantes fueron analizados usando el método OPA (% de grado de hidrólisis) y por HPLC ÄKTA para determinar la proteína solubilizada y digerida (véase el ejemplo monogástrico).

Pretratamiento de sobrenadantes in vitro con columnas EASY SPE

Antes del análisis en HPLC ÄKTA, los sobrenadantes del sistema *in vitro* fueron pretratados usando una purificación de muestras en fase sólida. Esto se realizó para mejorar la cromatografía y de ese modo prevenir los perfiles y líneas básicas de elución inestables. Las columnas usadas para la extracción eran columnas de extracción de fase sólida (Columnas Chromabond EASY SPE de Macherey-Nagel). Se eluyeron 2 ml de agua milliQ a través de las columnas mediante el uso de una cámara de vacío (vacío 0,15 x 100 kPa). Posteriormente 3 ml de muestra *in vitro* fue dispuesta sobre la columna y eluida (vacío de 0,1 x 100 kPa), los primeros ml de muestra eluida fueron retirados y un tubo limpio fue colocado debajo de la columna, el resto de la muestra fue eluido después y mantenido para una dilución complementaria.

Resultados

Los resultados mostrados en las Tablas 6 y 7 más abajo indican que el grado de proteasa aumentaba de forma significativa el grado de hidrólisis y de digestibilidad de la proteína.

TABLA 6
Grado de hidrólisis (DH)

Enzima (mg de EP/kg dieta)	n	De proteína total			Relativo al blanco		
		%DH		SD	%DH		%CV
Blanco	5	21,30	a	0,52	100,0	a	2,42
Proteasa de la invención (50)	5	21,98	b	0,22	103,2	b	1,00

Diferentes letras en la misma columna indican diferencias importantes (análisis de varianza, prueba Tukey-Kramer, P<0,05). SD = desviación estándar. %CV = Coeficiente de varianza = (valor SD/medio) X 100%

ES 2 315 666 T3

TABLA 7

Proteína cruda solubilizada v digerida

Enzima (mg de EP/kg dieta)	n	De proteína total						Relativa al blanco					
		%CP dig	a	SD	%CP sol	a	SD	%CP dig	a	% CV	%CP sol	a	CV %
Blanco	5	50,0	a	2,2	89,9	a	3,2	100,0	a	4,5	100,0	a	3,5
Proteasa de la invención (50)	5	52,3	b	1,1	91,4	a	1,5	104,8	b	2,1	101,7	a	1,6
(100)	5	53,4	b	0,4	91,6	a	1,0	107,0	b	0,7	101,9	a	1,1

Diferentes letras en la misma columna indican diferencias importantes (Análisis de varianza de un factor, prueba de Tukey-Kramer, P<0,05). SD = desviación estándar. %CV = Coeficiente de varianza = (valor SD/medio) X 100%.

Ejemplo 5

Construcción de cepas de *Bacillus subtilis* L2, L2 HV0 y L2 HV1

Dos variantes “de cola” (que poseen extensiones C-terminal) de la proteasa que poseen la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 1-188 de SEC ID N°: 2 fueron formadas también. La variante de cola llamada a partir de ahora L2 HV0 poseía los 8 aminoácidos suplementarios siguientes en el C-terminal: QSHVQSAP con la extensión de secuencia de ADN siguiente insertada enfrente del codón de detención TM (entre los nucleótidos 1059 y 1060 de SEC ID N°: 1): 5'-CAATCGCATGTTCAATCCGCTCCA-3' (SEC ID N°: 5).

La variante de cola llamada L2 HV1 poseía los 4 aminoácidos extra siguientes en el C-terminal: QSAP, con la extensión de secuencia de ADN siguiente insertada enfrente del codón de detención TAA (entre los nucleótidos 1059 y 1060 de SEC ID N°: 1): 5'-CAATCGGCTCCT-3' (SEC ID N°: 6).

Tres cepas de *Bacillus subtilis* fueron construidas: la primera alojando el constructo de ADN de codificación de la proteasa teniendo la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 1-188 de SEC ID N°: 2, llamada L2, y las otras dos alojando los constructos de ADN de codificación de las variantes de cola L2 HV0, y L2 HV1, respectivamente. Estos constructos fueron fusionados por PCR con respecto al ADN codificante del péptido señal a partir de SAVINASE™ *Bacillus clausii* (Takami,H.; Kobaiashi,T.; Kobaiashi,M.; Yamamoto,M.; Nakamura,S.; Aono,R.; Horikoshi,K.; Clonación molecular, secuencia de nucleótidos y expresión del gen estructural para proteasa alcalina de la especie *Bacillus alcalifilica* 221) Biosci. Biotechnol. Biochem. 56:1455 (1992) e integrado por recombinación homóloga en el genoma de la célula huésped de *Bacillus subtilis* (como se ha descrito en el Ejemplo 1). Los genes son expresados bajo el control de un sistema de promotor triple (como se ha descrito en WO 99/43835), consistiendo en los promotores del gen alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (amyL), gen alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (amyQ), y el promotor de *Bacillus turingiensis cryIIIA* incluyendo una secuencia estabilizante. El gen que codifica la acetiltransferasa de cloranfenicol fue usado como marcador. (Como está descrito en por ejemplo Diderichsen,B.; Poulsen, G.B.; Joergensen, S.T.; A useful cloning vector for *Bacillus subtilis*. Plasmid 30:312 (1993)).

Unos transformantes resistentes al cloranfenicol fueron controlados para determinar una actividad proteasa en placas de agar LB-PG con 1% de leche desnatada (con un suplemento de 6 µg/ml de cloranfenicol). Algunas colonias positivas de proteasa fueron analizadas después mediante una secuenciación del ADN del inserto para determinar una secuencia de ADN de gen correcto, y se seleccionó una cepa de cada constructo, llamadas cepa *B. subtilis* L2, *B. subtilis* L2 HV0, *B. subtilis* L2 HV1.

ES 2 315 666 T3

Ejemplo 6

*Fermentación de las cepas *B. subtilis* L2, L2 HV0 y L2 HV1*

5 Las tres cepas *B. subtilis* L2, L2 HV0 y L2 HV1, fueron fermentadas en una mesa de agitación rotatoria en frascos Erlenmeyer con deflectores de 500 ml conteniendo 100 ml de TY con un suplemento de 6 mg/l de cloramfinicol.

10 Seis frascos Erlenmeyer para cada una de las tres cepas *B. subtilis* fueron fermentados en paralelo. Dos de los seis frascos Erlenmeyer fueron incubados a 37°C (250 rpm), dos a 30°C (250 rpm), y los dos últimos a 26°C (250 rpm).

Una muestra fue tomada de cada frasco de agitación el día 1, 2 y 3 y analizada para determinar la actividad proteolítica.

15 TABLA 8

Actividad proteolítica a 37°C

Cepa	Valores relativos a 37°C		
	Día 1	Día 2	Día 3
L2	1,0	1,0	1,0
L2-HV1	1,4	1,3	1,2
L2-HV0	1,3	1,1	1,4

20 TABLA 9

Actividad proteolítica a 30°C

Cepa	Valores relativos a 30°C		
	Día 1	Día 2	Día 3
L2	1,0	1,0	1,0
L2-HV1	1,0	1,2	1,4
L2-HV0	1,1	1,3	1,3

25 TABLA 10

Actividad proteolítica a 26°C

Cepa	Valores relativos a 26°C		
	Día 1	Día 2	Día 3
L2	1,0	1,0	1,0
L2-HV1	1,3	1,1	1,1
L2-HV0	0,2	1,1	1,1

ES 2 315 666 T3

Como se puede ver en las tablas 8-10 más arriba, el efecto de las colas aumenta el nivel de expresión para la S2A proteasa de *Nocardiopsis dassonvillei*, subespecie *dassonvillei*, DSM 43235 cuando es expresada en *B. subtilis*. Se observa un incremento de hasta el 40% en este experimento, pero en general se observa una mejora para ambas variantes de cola, L2 HV1 y L2 HV0, a las tres temperaturas probadas.

Ejemplo 7

Proteasa 22

Una proteasa llamada "Proteasa 22" fue diseñada de tal forma que comprendiera los siguientes aminoácidos característicos de la parte madura (aminoácidos 1-188) de SEC ID N°: 2: 10Y, 38T, 82S, 95P, 99A, 100V, 114I, 118N, 120T, 122R, 125Q, 129Y, 130S, 131L, 165S, y 171Y; donde cada posición corresponde a una posición de SEC ID N°: 2.

La parte madura de la proteasa 22 representa los aminoácidos 1-196 de SEC ID N°: 8. La secuencia de ADN correspondiente a la SEC ID N°: 8 es la SEC ID N°: 7.

La secuencia de ADN de SEC ID N°: 7 fue construida e introducida en un huésped de *Bacillus* para la expresión. La proteasa expresada fue purificada y caracterizada como una proteasa alfa-lítica (familia peptidasa S1E y/o S2A).

La relación temperatura-actividad de la proteasa 22 fue medida a un pH 9, usando el ensayo Protazyme AK del Ejemplo 2. Con el fin de realizar una comparación, la proteasa de la especie *Nocardiopsis* NRRL 18262 fue incluida. Los resultados están mostrados en la Tabla 11 más abajo.

La temperatura de desnaturalización o de fusión de la proteasa 22 fue determinada como se ha descrito en el ejemplo 2 a una $T_m = 83.5^\circ\text{C}$.

TABLA 11

Perfiles de temperatura

Temperatura (°C)	Actividad relativa a pH 9	
	Proteasa 22	Proteasa de la especie <i>Nocardiopsis</i> , NRRL 18262
15	0,016	0,015
25	0,010	0,024
37	0,028	0,068
50	0,069	0,199
60	0,138	0,510
70	0,474	1,000
80	1,000	0,394
90	0,375	-

De estos resultados se deduce que la proteasa 22 tiene una temperatura de fusión más alta, y una temperatura óptima más alta a pH 9, ambas en comparación con la proteasa de la especie *Nocardiopsis*, NRRL 18262, es decir, un aumento de temperatura de fusión de $7,0^\circ\text{C}$, y un aumento de temperatura óptima de aproximadamente 10°C .

ES 2 315 666 T3

Ejemplo 8

Proteasa L2a

5 La parte madura de proteasa L2a representa los aminoácidos 1-189 de SEC ID N°: 10. La SEC ID N°: 9 es la secuencia de ADN correspondiente a SEC ID N°: 10.

La secuencia de ADN de SEC ID N°: 9 fue construida e introducida en un huésped de *Bacillus* para la expresión tal y como está descrito en el Ejemplo 1, y purificada tal y como está descrito en el Ejemplo 2.

10 La proteasa L2a es una proteasa alfa-lítica (familia peptidasa S1E y/o S2A).

La relación de actividad según la temperatura de la proteasa L2a fue medida a pH 9, usando el ensayo Protazyme AK del Ejemplo 2. Con el fin de realizar una comparación, la proteasa de la especie *Nocardiopsis*, NRRL 18262 (proteasa 10) fue incluida. Los resultados están mostrados en la Tabla 12 más abajo.

15 La desnaturalización o temperatura de fusión de la proteasa L2a fue determinada tal y como está descrito en el ejemplo 2 a una $T_m = 78.2^\circ\text{C}$.

20

TABLA 12

Perfil de actividad según la temperatura

25

Temperatura ($^\circ\text{C}$)	Proteasa L2a	Proteasa 10
15	0,02	0,02
25	0,02	0,02
37	0,05	0,07
50	0,13	0,20
60	0,31	0,51
70	0,79	1,00
80	1,00	0,39
90	0,28	-

50

A partir de estos resultados, se puede ver que la proteasa L2a presenta una temperatura de fusión más alta, y una temperatura óptima más alta a pH 9, ambas comparadas con la proteasa de la especie *Nocardiopsis*, NRRL 18262, es decir, un aumento de la temperatura de fusión de $1,7^\circ\text{C}$, y un aumento óptimo de la temperatura de aproximadamente 10°C .

55

Ejemplo 9

Proteasa 8

La parte madura de la proteasa 8 representa los aminoácidos 1-188 de SEC ID N°: 12. La SEC ID N°: 11 es la secuencia de ADN correspondiente a la SEC ID N°: 12.

65 La secuencia de ADN de SEC ID N°: 11 fue construida e introducida en un huésped *Bacillus* para la expresión tal y como está descrito en el Ejemplo 1, y purificada tal y como está descrito en el Ejemplo 2.

La proteasa 8 es una proteasa alfa-lítica (familia peptidasa S1E y/o S2A).

ES 2 315 666 T3

La relación temperatura-actividad de la proteasa 8 fue medida a pH 9, usando el ensayo con Protazyme AK del Ejemplo 2. Con el fin de realizar una comparación, la proteasa de especie *Nocardioopsis*, NRRL 18262 (proteasa 10) fue incluida. Los resultados están mostrados en la Tabla 13 más abajo.

- 5 La temperatura de desnaturalización o de fusión de la proteasa 8 fue determinada tal y como está descrito en el Ejemplo 2 a una $T_m = 78.3^\circ\text{C}$.

TABLA 13

10 *Perfil de actividad de temperatura*

15

Temperatura ($^\circ\text{C}$)	Proteasa 8	Proteasa 10
15	0,02	0,02
20	0,05	0,02
25	0,10	0,07
30	0,27	0,20
35	0,56	0,51
40	1,00	1,00
45	0,49	0,39
50	-	-

40 A partir de estos resultados, se puede ver que la Proteasa 8 presenta una temperatura de fusión más alta, y una temperatura más alta óptima a pH 9, ambas en comparación con la Proteasa 10, por ejemplo un aumento de la temperatura de fusión de $1,8^\circ\text{C}$.

45 Ejemplo 10

Rendimiento de la Proteasa L2a en un modelo monogástrico de digestión in vitro

50 El rendimiento de la proteasa purificada L2a descrita en el Ejemplo 8 fue evaluado en un modelo *in vitro* simulando la digestión en animales monogástricos, en comparación con la proteasa conocida derivada de la especie *Nocardioopsis*, NRRL 18262 ("Proteasa 10"). En particular, la proteasa fue evaluada para determinar su capacidad para mejorar la solubilización y digestión de las proteínas de maíz/SBM (harina de maíz/de soja). El sistema *in vitro* consistía en 18 frascos donde el sustrato de maíz/SBM fue incubado inicialmente con HCl/pepsina - simulando una digestión gástrica - y posteriormente con pancreatina - simulando una digestión intestinal. Ocho de los frascos fueron dosificados con la proteasa al principio de la fase gástrica mientras que los diez frascos restantes servían de blancos. Al final de la fase de incubación intestinal, las muestras de digestión *in vitro* fueron extraídas y analizadas para determinar la proteína solubilizada y digerida.

55

60

65

ES 2 315 666 T3

Resumen del procedimiento de digestión *in vitro*

Componentes añadidos	pH	Temperatura	Curso temporal	Fase de digestión simulada
10 g de sustrato de maíz/SBM (6:4), 41 ml de HCl (0,105M)	3,0	40°C	t=0 min	Mezcla
5 ml de HCl (0,105M) / pepsina (3000 U/g de sustrato), 1 ml de proteasa (para proporcionar 100 mg de proteína de enzima proteásica por kg de sustrato)	3,0	40°C	t=30 min	Digestión gástrica
16 ml H ₂ O	3,0	40°C	t= 1,0 hora	Digestión gástrica
7 ml de NaOH (0,39M)	6,8	40°C	t=1,5 horas	Digestión intestinal
5 ml de NaHCO ₃ (1M)/pancreatina (8 mg/g dieta)	6,8	40°C	t=2,0 horas	Digestión intestinal
Incubación final	7,0	40°C	t=6,0 horas	

Condiciones

- Sustrato: 4 g de SBM, 6 g de maíz (premezclado)
- pH: 3,0 fase estomacal/6,8-7,0 fase intestinal
- HCl: 0,105 M durante 1,5 horas (es decir, premezcla de 30 min de HCl-sustrato)
- pepsina: 3000 U/g por dieta durante 1 hora
- pancreatina: 8 mg/g por dieta durante 4 horas
- temperatura: 40°C.
- Replicados: n

Soluciones

- 0,39 M de NaOH
- 0,105 M de HCl
- 0,105 M de HCl conteniendo 6000 U de pepsina por 5 ml
- 1 M de NaHCO₃ conteniendo 16 mg de pancreatina por ml
- 125 mM de tampón NaAc, pH 6,0

Determinaciones de proteína enzimática

La cantidad de proteína de enzima proteásica (EP) es calculada en base a los valores A_{280} y a las secuencias de aminoácidos (composiciones de aminoácidos) usando los principios resumidos en S.C. Gill & P.H. von Hippel, Analytical Biochemistry 182, 319-326, (1989).

Procedimiento experimental para modelo *in vitro*

El procedimiento experimental fue tal y como se ha resumido más arriba. El pH fue medido en periodos de 1, 2,5, y 5,5 horas. Las incubaciones se terminaron después de 6 horas y unas muestras de 30 ml fueron retiradas y dispuestas en hielo antes del centrifugado (10000 x g, 10 min, 4°C). Los sobrenadantes fueron extraídos y almacenados a 20°C.

Análisis

Todas las muestras fueron analizadas para determinar el contenido de proteína solubilizada y digerida mediante el uso de una filtración en gel.

Estimación de proteína solubilizada y digerida

El contenido de proteína solubilizada en los sobrenadantes de las muestras digeridas *in vitro* fue calculado por cuantificación de la proteína bruta (CP) usando una HPLC de filtración en gel. Los sobrenadantes fueron descongelados, filtrados a través de filtros de policarbonato de 0,45 μM y diluidos (1:50, v/v) con H₂O. Las muestras diluidas fueron cromatografiadas por HPLC usando una columna de filtración en gel (Global) de péptido Superdex PE (7,5 x 300 mm). El eluyente usado para una elución isocrática fue un tampón de fosfato de sodio de 50 mM (pH 7,0) conteniendo 150 mM de NaCl. El volumen total de eluyente por prueba fue de 26 ml y el caudal fue de 0,4 ml/min. Unos perfiles de elución fueron registrados a 214 nm y el área total según los perfiles fue determinada por integración. Para calcular el contenido de proteína de las áreas integradas, se formó una curva de calibración ($R^2=0,9993$) a partir de una serie de dilución de una muestra de maíz/SBM de referencia digerida *in vitro* con un contenido de proteínas totales conocido. La determinación de proteína en esta muestra de referencia fue efectuada usando el método Kjeldahl (determinación de % de nitrógeno; A.O.A.C. (1984) Official Methods of Analysis 14th ed., Washington DC).

El contenido de proteína digerida fue calculado por integración del área del cromatograma correspondiente a péptidos y aminoácidos que poseen una masa molecular de 1500 dalton o menos (Savoie, L.; Gauthier, S.F. Dialysis Cell For The *In-vitro* Measurement Of Protein Digestibility. J. Food Sci. 1986, 51, 494-498; Babinszky, L.; Van, D.M.J.M.; Boer, H.; Den, H.L.A. An *In-vitro* Method for Prediction of The Digestible Crude Protein Content in Pig Feeds. J. Sci. Food Agr. 1990, 50, 173-178; Boisen, S.; Eggum, B.O. Critical Evaluation of *In-vitro* Methods for Estimating Digestibility in Simple-Stomach Animals. Nutrition Research Reviews 1991, 4, 141-162). Para determinar la línea de división de 1500 dalton, la columna de filtración en gel fue calibrada usando citocromo C (Boehringer Alemania), aptrotinina, gastrina I, y sustancia P (Sigma Aldrich, EEUU), como estándares de masa molecular.

Resultados

Los resultados mostrados en la Tabla 14 más abajo indican que la proteasa L2a, como la Proteasa 10, aumenta de forma significativa el nivel de proteína soluble y digerible con respecto al blanco. Además, se comprueba que al menos numéricamente, la proteasa L2a mejora el nivel de proteína digerible comparada con la Proteasa conocida 10.

TABLA 14

Proteína cruda solubilizada v digerida

Enzima	n	Relativa al blanco					
		% CP digerible		CV%	% CP soluble		% CV
Blanco	10	100,0	a	5,5	100,0	a	4,4
Proteasa L2a	3	116,1	b	0,7	107,2	b	1,1
Proteasa 10	5	112,1	b	1,0	110,2	b	0,6

Diferentes letras en el interior de la misma columna indican diferencias importantes (Análisis de varianza de un factor, prueba de Tukey-Kramer, $P<0,05$). SD = Desviación estándar. % CV = Coeficiente de varianza = (valor SD/medio) x 100%

Ejemplo 11

Prueba de alimentación de peces

Toda una reserva hembra de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), con una masa corporal inicial de aproximadamente 27,3 g, fue alimentada con una dieta básica práctica conteniendo 49% de SBM (Comida a base de Alubias de Soja) y 12% de FM (Comida para peces), sin (Control), y con, la adición de la proteasa de la invención teniendo

ES 2 315 666 T3

los aminoácidos 1-188 de SEC ID N°: 2, en una cantidad de 50 mg de proteína de enzima proteásica/kg de producto alimentario. Los peces fueron alimentados *ad libitum*. La prueba de alimentación fue realizada en tanques de 500 l, en parte de una unidad de semi-recirculación con una temperatura del agua de 15°C +/- 1°C, con 50 peces por tanque y 4 replicados por tratamiento. La supervivencia, crecimiento, y conversión del producto alimentario fueron medidos durante un periodo de alimentación de 85 días.

Los resultados están mostrados en la Tabla 15 más abajo. Un aumento importante del peso corporal fue obtenido al añadir la proteasa de la invención a la dieta.

TABLA 15

Resultados con peces in vivo

Tratamiento	% supervivencia	Masa corporal inicial / g	Masa corporal final / g	Aumento de peso / g
Control	100,0 +/- 0,0	27,3 +/- 0,0	305,0 +/- 5,3	277,7 +/- 5,3
Proteasa 1-188 de SEC ID N°: 2	100,0 +/- 0,0	27,3 +/- 0,0	333,5 +/- 4,7	306,2 +/- 4,7

Ejemplo 12

Degradación proteolítica de las principales proteínas de alubias de soja purificadas

Hemos estudiado la capacidad de la proteasa de la especie *Nocardia*, NRRL 18262 y la proteasa de la invención teniendo los aminoácidos 1-188 de SEC ID N°: 2 para degradar proteínas de alubias de soja purificadas. Las proteínas de soja purificadas estudiadas fueron tres factores llamados anti-nutritivos de proteína de soja: Aglutinina de soja (SBA), el inhibidor de tripsina Kunitz de soja, el inhibidor Bowman-Birk de soja; y dos de las principales proteínas de almacenamiento de soja: Glicinina y beta-conglicinina.

Estas proteínas de soja fueron obtenidas como sigue: la SBA fue purificada de harina de soja no calentada (prod. No. S-9633, Sigma) por cromatografía de afinidad usando N-aminocaproil-beta-d-galactopiranosilamina Sefarosa (Sigma). Las fracciones de elución de la columna fueron analizadas usando una SDS-PAGE (tris-glicina 4-20%), y unas fracciones conteniendo proteína esencialmente pura fueron agrupadas. La glicinina y beta-conglicinina de soja fueron purificadas según los procedimientos descritos por Fischer, M. *et al*: Enzymatic Extractability of Soybean Meal Proteins and Carbohydrates: Heat and Humidity Effects. J. Agric. Food Chem. 2001: 49: 4463-4469. El Inhibidor de Bowman-Birk y el inhibidor de tripsina Kunitz son productos comerciales (Sigma T-9777 y Fluka 93618, respectivamente).

Las proteínas de soja purificada fueron incubadas con las dos proteasas durante 4 horas a 37°C y pH 6,5 (proteasa: proteína de soja = 1:10, basada en A₂₈₀). Tampón de incubación: 50 mM de ácido dimetil glutárico, 150 mM de NaCl, 1 mM de CaCl₂, 0,01% de Tritón X-100, pH 6,5.

La capacidad de las proteasas para degradar cada una de estas cinco proteínas fue determinada como la reducción de intensidad relativa a la banda de proteína de soja intacta en geles de SDS-PAGE (4-20% de tris-glicina) teñidos con Azul Brillante Coomassie. En caso de glicinina y beta-conglicinina, los términos "banda de proteína de soja intacta" se refiere en efecto a dos y tres bandas, respectivamente, ya que estas dos proteínas, cuando están expuestas al entorno reductor en el gel de SDS-PAGE, se desnaturalizan formando dos y tres subunidades, respectivamente.

La intensidad de las bandas de proteína de soja intactas (antes y después del tratamiento con las dos proteasas) fue determinada mediante un escaneado de los geles de SDS teñidos, y la degradación de cada una de las cinco proteínas por cada una de las dos proteasas determinada como la intensidad de la banda de proteína de soja intacta respectiva después, relativa a la intensidad de la banda de proteína de soja intacta respectiva antes del tratamiento de proteasas. El porcentaje de degradación de proteína es calculado de la manera siguiente: 100% - ((intensidad de banda después/intensidad de banda antes) x 100%). Los resultados son mostrados en la Tabla 16 más abajo.

ES 2 315 666 T3

TABLA 16

Porcentaje de degradación de proteínas de soja aisladas

Proteasa	SBA	Inhibidor de Bowman-Birk	Inhibidor de tripsina Kunitz	Glicinina	Beta-conglicinina
De la especie <i>Nocardiosis</i> , NRRL 18262	100	35	94	98	95
Proteasa con aminoácidos 1-188 de SEC ID N°: 2	95	81	97	100	100

Ejemplo 13

Alimentos para animales y aditivos de alimentos para animales

Un aditivo de alimentos para animales comprendiendo la proteasa de la invención con los aminoácidos 1-188 de SEC ID N°: 2 en forma de vitaminas y premezcla mineral, es compuesto tal y como está mostrado en la Tabla 17 más abajo. Las vitaminas y los carotenoides están disponibles comercialmente de productos nutritivos DSM. Todas las cantidades son en g/kg.

TABLA 17

Composición de premezcla

Vitamina A	ROVIMIX A 500	4.00
Vitamina D3	ROVIMIX D3 500	1.00
Vitamina E	ROVIMIX E 50 Ads	8.00
Vitamina B2	ROVIMIX B2 80-SD	1.0
	Amarillo CAROPHYLL	10.0
	50% de Cloruro de colina, min.	300.0
Minerales	Óxido de Mn	60.0
	Óxido de Zn	12.0
	Monohidrato del sulfato de Fe	20.0
	Óxido de Cu	2.0
	Sulfato de Co	0.2
Enzima	Proteasa con aminoácidos 1-188 de SEC ID N°: 2 (proteína enzimática)	3.0
	Harinillas de trigo	578.8

La premezcla de la Tabla 17 es incluida en un producto alimentario para truchas con una composición tal y como está mostrada en la Tabla 18 más abajo. La cantidad de cada ingrediente está indicada en % (p/p). La concentración de proteasa de la invención en el producto alimentario es de 51 mg de proteína de enzima proteásica por kg.

ES 2 315 666 T3

TABLA 18

Composición de producto alimentario para truchas

5
10
15
20
25

Trigo	11,20
Soja	14,00
Harina de pescado	57,00
Aceite de soja	4,00
Almidón	8,00
Levadura	4,00
Cloruro de colina a 75%	0,10
Premezcla de Tabla 17	1,70

Referencias citadas en la descripción

30

Esta lista de referencias citada por el solicitante ha sido recopilada exclusivamente para la información del lector. No forma parte del documento de patente europea. La misma ha sido confeccionada con la mayor diligencia; la OEP sin embargo no asume responsabilidad alguna por eventuales errores u omisiones.

Documentos de patente citados en la descripción

35
40
45
50
55
60
65

- WO 8803947 A [0004] [0115]
- DK 199600013 [0004]
- WO 0158276 A [0004] [0065] [0065]
- JP 2255081 A [0005] [0115]
- DD 200432 [0006]
- JP 2003284571 A [0007]
- EP 0506448 A [0010]
- EP 897985 A [0059]
- WO 9522625 A [0059]
- WO 9600343 A [0059]
- WO 9617929 A [0060]
- WO 9830682 A [0060]
- WO 9835026 A [0060]
- WO 9900489 A [0060]
- WO 0026354 A [0060] [0060]
- WO 9616177 A [0060]
- WO 9401541 A [0267]
- EP 407225 A [0267]
- EP 260105 A [0267]
- WO 9535381 A [0267]
- WO 9600292 A [0267]
- WO 9530744 A [0267]
- WO 9425578 A [0267]
- WO 9514783 A [0267]
- WO 9522615 A [0267]
- WO 9704079 A [0267]
- WO 9707202 A [0267] [0282]
- GB 1296839 A [0267]
- WO 9402597 A [0267]
- WO 9418314 A [0267]
- WO 9526397 A [0267]
- WO 9623873 A [0267]

ES 2 315 666 T3

- WO 0026230 A [0060] [0060]
- WO 0183559 A [0060]
5 - EP 561907 A [0060]
- WO 0022103 A [0060]
- WO 03037914 A [0084]
10 - JP 2003284571 B [0115]
- WO 9600787 A [0134] [0176]
15 - WO 9533836 A [0150]
- EP 238023 A [0176]
- US 5689054 A [0186]
20 - US 6111168 A [0186]
- WO 9114772 A [0191]
25 - WO 00064247 A [0201]
- WO 0158275 A (0209) [0247] [0248] [0249]
[0249] [0252]
30 - WO 03044049 A [0240]
- WO 03048148 A [0240]
35 - WO 9401459 A [0241]
- WO 02090384 A [0241]
- US 09779334 B [0249]
40 - EP 258068 A [0267]
- EP 305216 A [0267]
45 - WO 9613580 A [0267]
- EP 218272 A [0267]
- EP 331376 A [0267]
50 - GB 1372034 A [0267]
- WO 9506720 A [0267]
55 - WO 9627002 A [0267]
- WO 9612012 A [0267]
60 - JP 64744992 B [0267]
- WO 9116422 A [0267]
- WO 9205249 A [0267]
- WO 9743424 A [0267]
- WO 0060060 A [0267]
- WO 0166712 A [0267]
- US 4435307 A [0268]
- US 5648263 A [0268]
- US 5691178 A [0268]
- US 5776757 A [0268]
- WO 8909259 A [0268]
- EP 0495257 A [0268]
- EP 531372 A [0268]
- W09611262A[0268]
- WO 9629397 A [0268]
- WO 9808940 A [0268]
- WO 9407998 A [0268]
- EP 0531315 A [0268]
- US 5457046 A [0268]
- US 5686593 A [0268]
- US 5763254 A [0268]
- WO 9524471 A [0268]
- WO 9812307 A [0268]
- WO 9901544 A [0268]
- WO 9324618 A [0269]
- WO 9510602 A [0269]
- WO 9815257 A [0269]
- US 4106991 A [0271]
- US 4661452 A [0271]
- GB 1483591 A [0271]
- EP 238216 A [0271]
- WO 9219709 A [0279]
- WO 9219708 A [0279]
- US 5955310 A [0295]
- WO 9943835 A [0329]

65 **Literatura no patente citada en la descripción**

LAO WILSON *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, vol. 62, 4256-4259 [0008]

ES 2 315 666 T3

- MITSUIKI SHINJI** *et al. Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2002, vol. 66, no. 1. 164-167 [0009]
Enzyme Nomenclature 1992 from NC-IUBMB *Academic Press* 1992. [0053]
- 5 *Eur. J. Biochem.*, 1994, vol. 223, 1-5 [0053]
Eur. J. Biochem., 1995, vol. 232, 1-6 [0053]
Eur. J. Biochem., 1996, vol. 237, 1-5 [0053]
- 10 *Eur. J. Biochem.*, 1997, vol. 250, 1-6 [0053]
Eur. J. Biochem., 1999, vol. 264, 610-650 [0053]
- 15 Handbook of Proteolytic Enzymes *Academic Press* 1998. [0054]
Biochem. J., 1993, vol. 290, 205-218 [0055]
MEROPS protease database, 2003, www.merops.ac.uk [0055]
- 20 **RAWLINGS, N.D. O'BRIEN, E. A. BARRETT, A.J. MEROPS**: the protease database *Nucleic Acids Res.*, 2002,
vol. 30, 343-346 [0055]
- 25 **NESS, J.E.** *et al. Nature Biotechnology*, 2002, vol. 20, no. 12. 1251-1255 [0059]
- W. R. **PEARSON** D. J. **LIPMAN** Improved Tools for Biological Sequence Analysis *PNAS*, 1988, vol. 85, 2444-
2448 [0063]
- W. R. **PEARSON** Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA *Methods in Enzymology*,
30 1990, vol. 183, 63-98 [0063]
- T. F. **SMITH** M. S. **WATERMAN** Smith-Waterman algorithm *J. Mol. Biol.*, 1981, vol. 147, 195-197 [0063]
- HIGGINS CABIOS**, 1989, vol. 5, 151-153 [0086]
- 35 **BOLTON MCCARTHY** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1962, vol. 48, 1390- [0099]
- H. **NEURATH** R.L. **HILL** The Proteins *Academic Press* 1979. [0103]
- 40 G.M. **GARRITY** J. G. **HOLT** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2001. vol. 1, [0109]
- INNIS** *et al.* PCR: A Guide to Methods and Application *Academic Press* 1990. [0120]
- FORD** *et al. Protein Expression and Purification*, 1991, vol. 2, 95-107 [0122]
- 45 **CUNNINGHAM WELLS** *Science*, 1989, vol. 244, 1081-1085 [0123]
- DE VOS** *et al. Science*, 1992, vol. 255, 306-312 [0123]
- 50 **SMITH** *et al. Journal of Molecular Biology*, 1992, vol. 224, 899-904 [0123]
- WLODAVER** *et al. FEBS Letters*, 1992, vol. 309, 59-64 [0123]
- VILLA-KAMAROFF** *et al. Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1978, vol. 75, 3727-3731
55 [0133]
- DEBOER** *et al. Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1983, vol. 80, 21-25 [0133]
- KAGAYA** *et al. Molecular and General Genetics*, 1995, vol. 248, 668-674 [0191]
- 60 **XU** *et al. Plant Molecular Biology*, 1993, vol. 22, 573-588 [0191]
- GASSER** *et al. Science*, 1990, vol. 244, 1293- [0195]
- 65 **POTRYKUS** *Bio/Technology*, 1990, vol. 8, 535- [0195]
- SHIMAMOTO** *et al. Nature*, 1989, vol. 338, 274- [0195]

ES 2 315 666 T3

- HOOYKAS SCHILPEROORT** *Plant Molecular Biology*, 1992, vol. 19, 15-38 [0196]
- CHRISTOU** *Plant Journal*, 1992, vol. 2, 275-281 [0196]
- 5 **SHIMAMOTO** *Current Opinion Biotechnology*, 1994, vol. 5, 158-162 [0196]
- VASIL et al.** *Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 667-674 [0196]
- OMIRULLEH et al.** *Plant Molecular Biology*, 1993, vol. 21, 415-428 [0196]
- 10 handbook Protein Expression: A Practical Approach *Oxford University Press* 1999. [0199]
- Gene expression systems: Using nature for the art of expression **MEADE**, H.M. *et al.* Expression of recombinant proteins in the milk of transgenic animals *Academic Press* 1999. [0200]
- 15 **EEC (1986)**: Directive de la Commission du 9 avril 1986 fixant la méthode de calcul de la valeur énergétique des aliments composés destinés à la volaille *Journal Officiel des Communautés Européennes*, 1986, vol. L130, 53-54 [0234]
- 20 Official Methods of Analysis Association of Official Analytical Chemists 1984. [0253]
- swine nutrition, committee on animal nutrition board of agriculture, national research council *National Academy Press* 1988. 2-6 [0254]
- 25 Useful proteins from recombinant bacteria *Scientific American*, 1980, vol. 242, 74-94 [0133]
- ROMANOS et al.** *Yeast*, 1992, vol. 8, 423-488 [0135]
- GUO SHERMAN** *Molecular Cellular Biology*, 1995, vol. 15, 5983-5990 [0145]
- 30 **SIMONEN PALVA** *Microbiological Reviews*, 1993, vol. 57, 109-137 [0147]
- EHRlich** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1978, vol. 75, 1433- [0161]
- 35 **CHANG COHEN** *Molecular General Genetics*, 1979, vol. 168, 111-115 [0169]
- YOUNG SPIZIZIN** *Journal of Bacteriology*, 1961, vol. 81, 823-829 [0169]
- DAVIDOFF-ABELSON** *Journal of Molecular Biology*, 1971, vol. 56, 209-221 [0169]
- 40 **SHIGEKAWA DOWER** *Biotechniques*, 1988, vol. 6, 742-751 [0169]
- KOEHLER THORNE** *Journal of Bacteriology*, 1987, vol. 169, 5771-5278 [0169]
- 45 Soc. App. Bacteriol. Symposium Series 1980. [0172]
- YELTON et al.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1984, vol. 81, 1470-1474 [0176]
- MALARDIER et al.** *Gene*, 1989, vol. 78, 147-156 [0176]
- 50 **BECKER GUARENTE** Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology *Academic Press, Inc.* vol. 194, 182-187 [0176]
- ITO et al.** *Journal of Bacteriology*, 1983, vol. 153, 163- [0176]
- 55 **HINNEN et al.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1978, vol. 75, 1920- [0176]
- Protein Purification VCH Publishers 1989. [0183]
- 60 **HORVATH et al.** *PNAS*, 2000, vol. 97, no. 4. 1914-1919 [0185]
- TAGUE et al.** *Plant Physiology*, 1988, vol. 86, 506- [0190]
- FRANCK et al.** *Cell*, 1980, vol. 21, 285-294 [0191]
- 65 *Plant Mo. Biol.*, vol. 18, 675-689 [0191]

ES 2 315 666 T3

ZHANG W MCELROY D. WU R Analysis of rice Act1 5' region activity in transgenic rice plants *Plant Cell*, 1991, vol. 3, 1155-1165 [0191]

EDWARDS CORUZZI *Ann. Rev. Genet.*, 1990, vol. 24, 275-303 [0191]

ITO et al. *Plant Mol. Biol.*, 1994, vol. 24, 863-878 [0191]

WU et al. *Plant and Cell Physiology*, 1998, vol. 39, 885-889 [0191]

CONRAD et al. *Journal of Plant Physiology*, 1998, vol. 152, 708-711 [0191]

CHEN et al. *Plant and Cell Physiology*, 1998, vol. 39, 935-941 [0191]

KYOZUKA et al. *Plant Physiology*, 1993, vol. 102, 991-1000 [0191]

MITRA HIGGINS *Plant Molecular Biology*, 1994, vol. 26, 85-93 [0191]

DARTOIS et al. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1993, vol. 1131, 253-360 [0267]

Current protocols in Molecular Biology *John Wiley and Sons* 1995. [0288]

DIDERICHSEN et al. *J. Bacteriol.*, 1990, vol. 172, 4315-4321 [0296]

Bacillus subtilis and other Gram-Positive Bacteria American Society for Microbiology 1993. 618- [0296]

S.C. GILL P.H. VON HIPPEL *Analytical Biochemistry*, 1989, vol. 182, 319-326 [0311] [0357]

NIELSEN, P.M. PETERSEN, D. DAMBMANN, C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis *J. Food Sci.*, 2001, vol. 66, 642-646 [0314]

SAVOIE, L. GAUTHIER, S.F. Dialysis Cell For The *In-vitro* Measurement Of Protein Digestibility *J. Food Sci.*, 1986, vol. 51, 494-498 [0317] [0361]

BABINSZKY, L. VAN, D.M.J.M. BOER, H. DEN, H.L.A. An *In-vitro* Method for Prediction of The Digestible Crude Protein Content in Pig Feeds *J. Sci. Food Agr.*, 1990, vol. 50, 173-178 [0317] [0361]

BOISEN, S. EGGUM, B.O. Critical Evaluation of *In-vitro* Methods for Estimating Digestibility in Simple- Stomach Animals *Nutrition Research Reviews*, 1991, vol. 4, 141-162 [0317] [0361]

Biosci. Biotechnol. Biochem., 1992, vol. 56, 1455- [0329]

DIDERICHSEN, B. POULSEN, G.B. JOERGENSEN, S.T. A useful cloning vector for *Bacillus subtilis* Plasmid, 1993, vol. 30, 312- [0329]

Official Methods of Analysis A.O.A.C. 1984. [0360]

FISCHER, M. et al. Enzymatic Extractability of Soybean Meal Proteins and Carbohydrates: Heat and Humidity Effects *J. Agric. Food Chem.*, 2001, vol. 49, 4463-4469 [0366]

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polipéptido aislado que posee una actividad proteasa, y que presenta una temperatura de fusión (T_m) de al menos 78°C, determinada por calorimetría diferencial de barrido (DSC) en 10 mM de tampón de sodio, 50 mM de cloruro de sodio, pH 7,0, usando una velocidad de barrido constante de 1,5°C/min, donde el polipéptido es seleccionado del grupo consistente en:
- 10 (a) un polipéptido que posee una secuencia de aminoácidos que presenta un grado de identidad con los aminoácidos 1 a 188 de SEC ID N°: 2 y/o 1 a 188 de SEC ID N°: 12 de al menos el 60%;
- 15 (b) un polipéptido que es codificado por una secuencia de ácidos nucleicos que se hibridiza en condiciones de astringencia alta con cualquiera de los nucleótidos 499-1062 de SEC ID N°: 1, y/o 502-1065 de SEC ID N°: 11; y
- 20 (c) un polipéptido que es codificado por una secuencia de ácidos nucleicos que presenta un grado de identidad para cualquiera de los nucleótidos 499-1062 de SEC ID N°: 1, y/o 502-1065 de SEC ID N°: 11 de al menos el 72%.
2. Polipéptido según la reivindicación 1 que
- 25 (a) posee un grado de identidad con los aminoácidos 1 a 196 de SEC ID N°: 8 de al menos el 87%;
- (b) es codificado por una secuencia de ácidos nucleicos que se hibridiza en condiciones de astringencia media con los nucleótidos 577-1164 de SEC ID N°: 7; y/o
- 30 (c) es codificado por una secuencia de ácidos nucleicos que presenta un grado de identidad con los nucleótidos 577-1164 de SEC ID N°: 7 de al menos el 66%.
3. Polipéptido según la reivindicación 1 que
- 35 (a) presenta un grado de identidad con los aminoácidos 1 a 189 de SEC ID N°: 10 de al menos el 93%;
- (b) es codificado por una secuencia de ácidos nucleicos que se hibridiza en condiciones de astringencia muy alta con los nucleótidos 586-1152 de SEC ID N°: 9. y/o
- 40 (c) es codificado por una secuencia de ácidos nucleicos que presenta un grado de identidad con los nucleótidos 586-1152 de SEC ID N°: 9 de al menos el 95%.
4. Ácido nucleico aislado comprendiendo un ácido nucleico que codifica el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
5. Ácido nucleico aislado comprendiendo un ácido nucleico que codifica un polipéptido que posee una actividad proteasa y una temperatura de fusión (T_m) de al menos 78°C, determinada por calorimetría diferencial de barrido (DSC) en 10 mM de fosfato de sodio, 50 mM de tampón de cloruro de sodio, pH 7,0, usando una velocidad de barrido constante de 1,5°C/min, donde el ácido nucleico
- 45 (a) se hibridiza en condiciones de astringencia alta con cualquiera de los nucleótidos 499-1062 de SEC ID N°: 1, y/o 502 1065 de SEC ID N°: 11; (b) presenta un grado de identidad con cualquiera de los nucleótidos 499-1062 de SEC ID N°: 1, y/o 502-1065 de SEC ID N°: 11 de al menos el 72%; y/o
- 50 (c) codifica un polipéptido que presenta un grado de identidad con los aminoácidos 1 a 188 de SEC ID N°: 2 y/o 1 a 188 de SEC ID N°: 12 de al menos el 60%.
- 55 6. Ácido nucleico según la reivindicación 5 que
- (a) se hibridiza en condiciones de astringencia media con los nucleótidos 577-1164 de SEC ID N°: 7;
- 60 (b) presenta un grado de identidad con los nucleótidos 577-1164 de SEC ID N°: 7 de al menos el 66%; y/o
- (c) codifica un polipéptido que presenta un grado de identidad con los aminoácidos 1 a 196 de SEC ID N°: 8 de al menos el 87%.
- 65 7. Ácido nucleico según la reivindicación 5 que
- (a) se hibridiza en condiciones de astringencia muy alta con los nucleótidos 586-1152 de SEC ID N°: 9;
- (b) presenta un grado de identidad con los nucleótidos 586-1152 de SEC ID N°: 9 de al menos el 95%; y/o

ES 2 315 666 T3

(c) codifica un polipéptido que presenta un grado de identidad con los aminoácidos 1 a 189 de SEC ID N°: 10 de al menos el 93%.

5 8. Constructo de ácidos nucleicos comprendiendo el ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 4-7 enlazado operativamente con una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un huésped de expresión adecuada.

9. Vector de expresión recombinante comprendiendo el constructo de ácido nucleico según la reivindicación 8.

10 10. Célula huésped recombinante comprendiendo el constructo de ácido nucleico de la reivindicación 8 o el vector de la reivindicación 9.

11 11. Método para la producción de un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, método comprendiendo: (a) el cultivo de una célula huésped recombinante de la reivindicación 10 para producir un sobrenadante comprendiendo el polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.

12. Planta, o parte de planta, transgénica capaz de expresar el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-3.

20 13. Animal transgénico no humano, o productos, o elementos del mismo, capaces de expresar el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3.

14. Método para la producción de un polipéptido según la reivindicación 1, el método comprendiendo

25 (a) el cultivo de cualquiera de las cepas siguientes:

(i) *Nocardiopsis dassonvillei*, subespecie *dassonvillei* DSM 43235,

30 (ii) una especie *Nocardiopsis* DSM 16424, o

(iii) *Nocardiopsis alba* DSM 15647; y

(b) recuperación del polipéptido.

35 15. Uso de al menos un polipéptido tal y como está definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-3 (i) en alimentos para animales; (ii) en la preparación de una composición para usar en alimentos para animales; (iii) para mejorar el valor nutritivo de un alimento para animales; (iv) para aumentar la proteína digerible y/o soluble en dietas de animales; (v) para aumentar el grado de hidrólisis de las proteínas en dietas de animales; y/o (vi) para el tratamiento de las proteínas.

40 16. Aditivo de alimentos para animales comprendiendo al menos un polipéptido tal y como está definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-3. y

45 (a) al menos una vitamina liposoluble, y/o

(b) al menos una vitamina hidrosoluble, y/o

(c) al menos un oligoelemento.

50 17. Composición de alimentos para animales que posee un contenido de proteínas brutas de 50 a 800 g/kg y comprendiendo al menos un polipéptido tal como está definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o al menos un aditivo de producto alimentario según la reivindicación 16.

55 18. Composición de alimentos para animales según la reivindicación 17 que es un producto alimentario para peces.

19. Composición comprendiendo al menos un polipéptido tal como está definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-3, con al menos otra enzima seleccionada entre una amilasa, fitasa, xilanasas, galactanasas, alfa-galactosidasas, proteasas, fosfolipasas, y/o beta-glucanasas.

60 20. Uso de al menos un polipéptido tal como está definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en detergentes.

21. Especie *Nocardiopsis* DSM 16424.

22. *Nocardiopsis alba* DSM 15647.

65

ES 2 315 666 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Novozymes A/S
- <120> Proteasas
- 5 <130> 10436.504-WO
- <160> 12
- <170> PatentIn versión 3.2
- 10 <210> 1
- <211> 1065
- <212> ADN
- <213> *Nocardopsis dassonvillei*, subespecie *dassonvillei* DSM 43235
- 15 <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(1062)
- 20 <220>
- <221> mat_péptido
- <222> (499)..(1062)
- 25 <400>1

30	<pre> gct ccg gcc ccc gtc ccc cag acc ccc gtc gcc gac gac agc gcc Ala Pro Ala Pro Val Pro Gln Thr Pro Val Ala Asp Asp Ser Ala -165 -160 -155 </pre>	45
35	<pre> gcc agc atg acc gag gcg ctc aag cgc gac ctc gac ctc acc tcg Ala Ser Met Thr Glu Ala Leu Lys Arg Asp Leu Asp Leu Thr Ser -150 -145 -140 </pre>	90
40	<pre> gcc gag gcc gag gag ctt ctc tcg gcg cag gaa gcc gcc atc gag Ala Glu Ala Glu Glu Leu Leu Ser Ala Gln Glu Ala Ala Ile Glu -135 -130 -125 </pre>	135
45	<pre> acc gac gcc gag gcc acc gag gcc gcg ggc gag gcc tac ggc ggc Thr Asp Ala Glu Ala Thr Glu Ala Ala Gly Glu Ala Tyr Gly Gly -120 -115 -110 </pre>	180
50	<pre> tca ctg ttc gac acc gag acc ctc gaa ctc acc gtg ctg gtc acc gac Ser Leu Phe Asp Thr Glu Thr Leu Glu Leu Thr Val Leu Val Thr Asp -105 -100 -95 </pre>	228
55	<pre> gcc tcc gcc gtc gag gcg gtc gag gcc acc gga gcc cag gcc acc gtc Ala Ser Ala Val Glu Ala Val Glu Ala Thr Gly Ala Gln Ala Thr Val -90 -85 -80 -75 </pre>	276
60	<pre> gtc tcc cac ggc acc gag ggc ctg acc gag gtc gtg gag gac ctc aac Val Ser His Gly Thr Glu Gly Leu Thr Glu Val Val Glu Asp Leu Asn -70 -65 -60 </pre>	324
65	<pre> ggc gcc gag gtc ccc gag agc gtc ctc ggc tgg tac ccg gac gtg gag Gly Ala Glu Val Pro Glu Ser Val Leu Gly Trp Tyr Pro Asp Val Glu -55 -50 -45 </pre>	372
70	<pre> agc gac acc gtc gtg gtc gag gtg ctg gag ggc tcc gac gcc gac gtc Ser Asp Thr Val Val Val Glu Val Leu Glu Gly Ser Asp Ala Asp Val -40 -35 -30 </pre>	420
75	<pre> gcc gcc ctg ctc gcc gac gcc ggt gtg gac tcc tcc tcg gtc cgg gtg Ala Ala Leu Leu Ala Asp Ala Gly Val Asp Ser Ser Val Arg Val -25 -20 -15 </pre>	468
80	<pre> gag gag gcc gag gag gcc ccg cag gtc tac gcc gac atc atc ggc ggc </pre>	516

ES 2 315 666 T3

	Glu	Glu	Ala	Glu	Glu	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Ala	Asp	Ile	Ile	Gly	Gly		
	-10					-5				-1	1				5			
5	ctg	gcc	tac	tac	atg	ggc	ggc	cgc	tgc	tcc	gtc	ggc	ttc	gcc	ggc	acc	564	
	Leu	Ala	Tyr	Tyr	Met	Gly	Gly	Arg	Cys	Ser	Val	Gly	Phe	Ala	Ala	Thr		
				10					15					20				
10	aac	agc	gcc	ggg	cag	ccc	ggg	ttc	gtc	acc	ggc	ggc	cac	tgc	ggc	acc	612	
	Asn	Ser	Ala	Gly	Gln	Pro	Gly	Phe	Val	Thr	Ala	Gly	His	Cys	Gly	Thr		
			25					30					35					
15	gtc	ggc	acc	ggc	gtg	acc	atc	ggc	aac	ggc	acc	ggc	acc	ttc	cag	aac	660	
	Val	Gly	Thr	Gly	Val	Thr	Ile	Gly	Asn	Gly	Thr	Gly	Thr	Phe	Gln	Asn		
		40					45					50						
20	tcg	gtc	ttc	ccc	ggc	aac	gac	gcc	gcc	ttc	gtc	cgc	ggc	acc	tcc	aac	708	
	Ser	Val	Phe	Pro	Gly	Asn	Asp	Ala	Ala	Phe	Val	Arg	Gly	Thr	Ser	Asn		
	55					60					65					70		
25	ttc	acc	ctg	acc	aac	ctg	gtc	tcg	cgc	tac	aac	tcc	ggc	ggc	tac	cag	756	
	Phe	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Val	Ser	Arg	Tyr	Asn	Ser	Gly	Gly	Tyr	Gln		
					75					80					85			
30	tcg	gtg	acc	ggg	acc	agc	cag	gcc	ccg	ggc	ggc	tcg	ggc	gtg	tgc	cgc	804	
	Ser	Val	Thr	Gly	Thr	Ser	Gln	Ala	Pro	Ala	Gly	Ser	Ala	Val	Cys	Arg		
				90					95					100				
35	tcc	ggc	tcc	acc	acc	ggc	tgg	cac	tgc	ggc	acc	atc	cag	gcc	cgc	aac	852	
	Ser	Gly	Ser	Thr	Thr	Gly	Trp	His	Cys	Gly	Thr	Ile	Gln	Ala	Arg	Asn		
			105					110					115					
40	cag	acc	gtg	cgc	tac	ccg	cag	ggc	acc	gtc	tac	tcg	ctc	acc	cgc	acc	900	
	Gln	Thr	Val	Arg	Tyr	Pro	Gln	Gly	Thr	Val	Tyr	Ser	Leu	Thr	Arg	Thr		
			120				125					130						
45	aac	gtg	tgc	ggc	gag	ccc	ggc	gac	tcc	ggc	ggg	tcg	ttc	atc	tcc	ggc	948	
	Asn	Val	Cys	Ala	Glu	Pro	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Ser	Phe	Ile	Ser	Gly		
	135					140					145					150		
50	tcg	cag	ggc	cag	ggc	gtc	acc	tcc	ggc	ggc	tcc	ggc	aac	tgc	tcc	gtc	996	
	Ser	Gln	Ala	Gln	Gly	Val	Thr	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Asn	Cys	Ser	Val		
				155						160				165				
55	ggc	ggc	acg	acc	tac	tac	cag	gag	gtc	acc	ccg	atg	atc	aac	tcc	tgg	1044	
	Gly	Gly	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Gln	Glu	Val	Thr	Pro	Met	Ile	Asn	Ser	Trp		
				170					175					180				
60	ggg	gtc	agg	atc	cgg	acc	taa										1065	
	Gly	Val	Arg	Ile	Arg	Thr												
			185															
65	<210>	2																
	<211>	354																
	<212>	PRT																
	<213>	<i>Nocardiosis dassonvillei</i> , subespecie <i>dassonvillei</i> DSM 43235																
	<400>	2																
65			Ala	Pro	Ala	Pro	Val	Pro	Gln	Thr	Pro	Val	Ala	Asp	Asp	Ser	Ala	
			-165						-160					-155				
			Ala	Ser	Met	Thr	Glu	Ala	Leu	Lys	Arg	Asp	Leu	Asp	Leu	Thr	Ser	
			-150						-145					-140				
			Ala	Glu	Ala	Glu	Glu	Leu	Leu	Ser	Ala	Gln	Glu	Ala	Ala	Ile	Glu	

ES 2 315 666 T3

	135		140		145		150									
5	Ser	Gln	Ala	Gln	Gly	Val	Thr	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Asn	Cys	Ser	Val
				155						160					165	
10	Gly	Gly	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Gln	Glu	Val	Thr	Pro	Met	Ile	Asn	Ser	Trp
				170					175					180		
	Gly	Val	Arg	Ile	Arg	Thr										
			185													

15 <210> 3
 <211> 48
 <212> ADN
 20 <213> Sintética
 <220>
 <221> misc_característica
 25 <223> Iniciador
 <400> 3

30 **gcttttagtt catcgatcgc atcggctgct ccggccccg tccccag 48**

35 <210> 4
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Sintética
 40 <220>
 <221> misc_característica
 <223> Iniciador
 45 <400> 4

50 **gcggatccta ttaggtctg atcctgacac cccag 35**

55 <210> 5
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Sintética
 60 <220>
 <221> misc_característica
 <223> Iniciador
 65 <400> 5

caatcgatg ttcaatccgc tcca 24

ES 2 315 666 T3

<210> 6
<211> 12
<212> ADN
5 <213> Sintética

<220>
<221> misc_característica
10 <223> Iniciador

<400> 6

15 **caatcggctc ct** **12**

<210> 7
20 <211> 1164
<212> ADN
<213> Sintética (“Proteasa 22”)

25 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(1164)

30 <220>
<221> sig_péptido
<222> (1)..(81)

35 <220>
<221> misc_característica
<222> (82)..(576)
40 <223> Propéptido
<220>
<221> mat_péptido
45 <222> (577)..(1164)

50

55

60

65

ES 2 315 666 T3

<400> 7

5	atg aaa aaa ccg ctg gga aaa att gtc gca agc aca gca ctt ctt Met Lys Lys Pro Leu Gly Lys Ile Val Ala Ser Thr Ala Leu Leu -190 -185 -180	45
10	att tca gtg gca ttt agc tca tct att gca tca gca gct aca gga Ile Ser Val Ala Phe Ser Ser Ile Ala Ser Ala Ala Thr Gly -175 -170 -165	90
15	gca tta ccg cag tct ccg aca ccg gaa gca gat gca gtc tca atg Ala Leu Pro Gln Ser Pro Thr Pro Glu Ala Asp Ala Val Ser Met -160 -155 -150	135
20	caa gaa gca ctg caa aga gat ctt gat ctt aca tca gca gaa gca Gln Glu Val Ala Phe Ser Arg Asp Leu Asp Leu Thr Ser Ala Glu Ala -145 -140 -135	180
25	gaa gaa ctt ctt gct gca caa gat aca gca ttt gaa gtg gat gaa Glu Glu Leu Leu Ala Ala Gln Asp Thr Ala Phe Glu Val Asp Glu -130 -125 -120	225
30	gca gcg gca gaa gca gca gga gat gca tat ggc ggc tca gtt ttt Ala Ala Ala Glu Ala Ala Gly Asp Ala Tyr Gly Gly Ser Val Phe -115 -110 -105	270
35	gat aca gaa tca ctt gaa ctt aca gtt ctt gtt aca gat gca gca gca Asp Thr Glu Ser Leu Glu Leu Thr Val Leu Val Thr Asp Ala Ala Ala -100 -95 -90	318
40	gtt gaa gca gtt gaa gca aca gga gca gga aca gta ctt gtt tca tat Val Glu Ala Val Glu Ala Thr Gly Ala Gly Thr Val Leu Val Ser Tyr -85 -80 -75	366
45	gga att gat ggc ctt gat gaa att gtt caa gaa ctg aat gca gct gat Gly Ile Asp Gly Leu Asp Glu Ile Val Gln Glu Leu Asn Ala Ala Asp -70 -65 -60 -55	414
50	gct gtt ccg ggc gtt gtt ggc tgg tat ccg gat gtt gct gga gat aca Ala Val Pro Gly Val Val Gly Trp Tyr Pro Asp Val Ala Gly Asp Thr -50 -45 -40	462
55	gtt gtc ctt gaa gtt ctt gaa gga tca ggc gca gat gtt tca ggc ctg	510

ES 2 315 666 T3

val val Leu Glu val Leu Glu Gly Ser Gly Ala Asp Val Ser Gly Leu
 -35 -30 -25
 5 ctg gca gac gca gga gtc gat gca tca gca gtt gaa gtt aca aca tca 558
 Leu Ala Asp Ala Gly Val Asp Ala Ser Ala Val Glu Val Thr Thr Ser
 -20 -15 -10
 10 gat caa ccg gaa ctt tat gca gat att att ggc ggc ctg gca tat tat 606
 Asp Gln Pro Glu Leu Tyr Ala Asp Ile Ile Gly Gly Leu Ala Tyr Tyr
 -5 -1 1 5 10
 15 atg ggc ggc aga tgc agc gtt ggc ttt gca gca aca aat gca tca ggc 654
 Met Gly Gly Arg Cys Ser Val Gly Phe Ala Ala Thr Asn Ala Ser Gly
 25
 20 caa ccg ggc ttt gtt aca gca ggc cat tgc ggc aca gtt ggc aca cca 702
 Gln Pro Gly Phe Val Thr Ala Gly His Cys Gly Thr Val Gly Thr Pro
 30
 25 gtt tca att ggc aat ggc aaa ggc gtt ttt gaa cga agc att ttt ccg 750
 Val Ser Ile Gly Asn Gly Lys Gly Val Phe Glu Arg Ser Ile Phe Pro
 45 50 55
 30 ggc aat gat tca gca ttt gtt aga ggc aca tca aat ttt aca ctt aca 798
 Gly Asn Asp Ser Ala Phe Val Arg Gly Thr Ser Asn Phe Thr Leu Thr
 60 65 70
 35 aat ctg gtt tca aga tat aat tca ggc ggc tat gca aca gtt gca ggc 846
 Asn Leu Val Ser Arg Tyr Asn Ser Gly Gly Tyr Ala Thr Val Ala Gly
 75 80 85 90
 40 cat aat caa gca ccg att ggc tca gca gtt tgc aga tca ggc tca aca 894
 His Asn Gln Ala Pro Ile Gly Ser Ala Val Cys Arg Ser Gly Ser Thr
 95 100 105
 45 aca ggc tgg cat tgc ggc aca att caa gca aga aat caa aca gtt agg 942
 Thr Gly Trp His Cys Gly Thr Ile Gln Ala Arg Asn Gln Thr Val Arg
 110 115 120
 50 tat ccg caa ggc aca gtt tat agt ctg aca aga aca aca gtt tgt gca 990
 Tyr Pro Gln Gly Thr Val Tyr Ser Leu Thr Arg Thr Thr Val Cys Ala
 125 130 135
 55 gaa ccg ggc gat tca ggc ggc tca tat att agc ggc act caa gca caa 1038
 Glu Pro Gly Asp Ser Gly Gly Ser Tyr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Gln
 140 145 150
 60 ggc gtt aca tca ggc ggc tca ggc aat tgc agt gct ggc ggc aca aca 1086
 Gly Val Thr Ser Gly Gly Ser Gly Asn Cys Ser Ala Gly Gly Thr Thr
 155 160 165 170
 65 tat tac caa gaa gtt aat ccg atg ctt agt tca tgg ggc ctt aca ctt 1134
 Tyr Tyr Gln Glu Val Asn Pro Met Leu Ser Ser Trp Gly Leu Thr Leu
 175 180 185
 70 aga aca caa tcg cat gtt caa tcc gct cca 1164
 Arg Thr Gln Ser His Val Gln Ser Ala Pro
 190 195

<210> 8

55 <211> 388

<212> PRT

<213> Sintética ("Proteasa 22")

60

65

ES 2 315 666 T3

<400> 8

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

ES 2 315 666 T3

```

                140                145                150
cag gcc cag ggc gtc acc tcc ggc ggc tcc ggc aac tgc tcc ttc ggc      1086
Gln Ala Gln Gly Val Thr Ser Gly Gly Ser Gly Asn Cys Ser Phe Gly
5
ggc acg acc tac tac cag gag gtc gcc ccg atg atc aac tcc tgg ggc      1134
Gly Thr Thr Tyr Tyr Gln Glu Val Ala Pro Met Ile Asn Ser Trp Gly
170                175                180

10
gtt cgc atc cgc acc agc tga      1155
Val Arg Ile Arg Thr Ser
185

```

```

15 <210> 10
    <211> 384
    <212> PRT
20 <213> Especie Nocardiosis, DSM 16424
    <400> 10

```

```

25 Met Arg Pro Ser Thr Ile Ala Ser Ala Val Gly Thr Gly Ala Leu
   -195                -190                -185

30 Ala Phe Gly Leu Ala Leu Ser Met Ala Pro Gly Ala Leu Ala Ala
   -180                -175                -170

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

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

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

50 Asp Ala Glu Ala Ala Glu Ala Ala Gly Glu Ala Tyr Gly Gly Ser
   -120                -115                -110

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

60 Thr Ala Val Asp Ala Val Glu Ala Thr Gly Ala Glu Ala Thr Val Val
   -85                -80                -75

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

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

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

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

```

ES 2 315 666 T3

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

<210> 11

<211> 1068

<212> ADN

<213> *Nocardiopsis alba* DSM 15647

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1065)

<220>

<221> mat_péptido

<222> (502)..(1065)

ES 2 315 666 T3

<220>

<221> sig_péptido

<222> (502)..(1065)

5

<400> 11

10	gcg acc ggc ccc ctc ccc cag tcc ccc acc ccg gat gaa gcc gag Ala Thr Gly Pro Leu Pro Gln Ser Pro Thr Pro Asp Glu Ala Glu -165 -160 -155	45
15	gcc acc acc atg gtc gag gcc ctc cag cgc gac ctc ggc ctg tcc Ala Thr Thr Met Val Glu Ala Leu Gln Arg Asp Leu Gly Leu Ser -150 -145 -140	90
20	ccc tct cag gcc gac gag ctc ctc gag gcg cag gcc gag tcc ttc Pro Ser Gln Ala Asp Glu Leu Leu Gln Ala Gln Ala Glu Ser Phe -135 -130 -125	135
25	gag atc gac gag gcc gcc acc gcg gcc gca gcc gac tcc tac gcc Glu Ile Asp Glu Ala Ala Thr Ala Ala Ala Ala Asp Ser Tyr Gly -120 -115 -110	180
30	ggc tcc atc ttc gac acc gac agc ctc acc ctg acc gtc ctg gtc acc Gly Ser Ile Phe Asp Thr Asp Ser Leu Thr Leu Thr Val Leu Val Thr -105 -100 -95	228
35	gac gcc tcc gcc gtc gag gcg gtc gag gcc gcc ggc gcc gag gcc aag Asp Ala Ser Ala Val Glu Ala Val Glu Ala Ala Gly Ala Glu Ala Lys -90 -85 -80	276
40	gtg gtc tcg cac ggc atg gag ggc ctg gag gag atc gtc gcc gac ctg Val Val Ser His Gly Met Glu Gly Leu Glu Glu Ile Val Ala Asp Leu -75 -70 -65 -60	324
45	aac gcg gcc gac gct cag ccc ggc gtc gtg ggc tgg tac ccc gac atc Asn Ala Ala Asp Ala Gln Pro Gly Val Val Gly Trp Tyr Pro Asp Ile -55 -50 -45	372
50	cac tcc gac acg gtc gtc ctc gag gtc ctc gag ggc tcc ggt gcc gac His Ser Asp Thr Val Val Leu Glu Val Leu Glu Gly Ser Gly Ala Asp -40 -35 -30	420
55	gtg gac tcc ctg ctc gcc gac gcc ggt gtg gac acc gcc gac gtc aag Val Asp Ser Leu Leu Ala Asp Ala Gly Val Asp Thr Ala Asp Val Lys -25 -20 -15	468
60	gtg gag agc acc acc gag cag ccc gag ctg tac gcc gac atc atc ggc Val Glu Ser Thr Thr Glu Gln Pro Glu Leu Tyr Ala Asp Ile Ile Gly -10 -5 -1 1 5	516
65	ggt ctc gcc tac acc atg ggt ggg cgc tgc tcg gtc ggc ttc gcg gcc Gly Leu Ala Tyr Thr Met Gly Gly Arg Cys Ser Val Gly Phe Ala Ala 10 15 20	564
70	acc aac gcc tcc ggc cag ccc ggg ttc gtc acc gcc ggc cac tgc ggc Thr Asn Ala Ser Gly Gln Pro Gly Phe Val Thr Ala Gly His Cys Gly 25 30 35	612
75	acc gtc ggc acc ccg gtc agc atc ggc aac ggc cag ggc gtc ttc gag Thr Val Gly Thr Pro Val Ser Ile Gly Asn Gly Gln Gly Val Phe Glu 40 45 50	660
80	cgt tcc gtc ttc ccc ggc aac gac tcc gcc ttc gtc cgc ggc acc tcg Arg Ser Val Phe Pro Gly Asn Asp Ser Ala Phe Val Arg Gly Thr Ser 55 60 65	708
85	aac ttc acc ctg acc aac ctg gtc agc cgc tac aac acc ggt ggt tac Asn Phe Thr Leu Thr Asn Leu Val Ser Arg Tyr Asn Thr Gly Gly Tyr 70 75 80 85	756

ES 2 315 666 T3

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