



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 605**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/16** (2006.01)

**C12N 15/55** (2006.01)

**C12N 15/11** (2006.01)

**C12P 21/02** (2006.01)

**C12N 1/20** (2006.01)

**A23K 1/165** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05800350 .0**

96 Fecha de presentación : **17.10.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1802750**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.07.2007**

54 Título: **Fitasas.**

30 Prioridad: **18.10.2004 GB 0423139**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**10.08.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**10.08.2011**

73 Titular/es: **DANISCO A/S**  
**Langebrogade 1**  
**P.O. Box 17**  
**1001 Copenhagen K., DK**

72 Inventor/es: **Miasnikov, Andrei;**  
**Kumar, Vijay;**  
**Kensch, Oliver;**  
**Pellengahr, Klaus;**  
**Leuthner, Birgitta;**  
**Kettling, Ulrich y**  
**Koltermann, Andre**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 363 605 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

Fitasas

La presente invención se refiere a fitasas, secuencias nucleotídicas para las mismas, métodos de producción de las fitasas y sus usos.

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al ámbito de las enzimas para aditivos para productos alimentarios para consumo animal. Más específicamente, la presente invención se refiere a fitasas que se pueden utilizar para mejorar la digestión del fosfato en los alimentos y los piensos para consumo animal.

## ANTECEDENTES TÉCNICOS Y TÉCNICA PREVIA

- 10 El fitato es la principal forma de almacenamiento del fósforo en los cereales y las legumbres. No obstante, los animales monogástricos, tales como el cerdo, las aves de corral y los peces, no son capaces de metabolizar ni de absorber el fitato (o ácido fítico) y, por lo tanto, se excreta, lo que conduce a la contaminación con fósforo en zonas de cría intensiva de ganado. Además, el ácido fítico también actúa como un agente antinutricional en los animales monogástricos al atrapar metales, tales como el calcio, el cobre y el zinc.
- 15 Para proporcionar suficientes fosfatos para el crecimiento y la salud de estos animales, se añade fosfato inorgánico a su dieta. Tal adición puede ser costosa y además aumenta los problemas de contaminación.

Mediante la acción de la fitasa, el fitato se hidroliza por lo general para dar inositol-fosfatos inferiores y fosfato inorgánico. Las fitasas son útiles como aditivos de las comidas para animales, en las que mejoran la disponibilidad del fósforo orgánico para el animal y disminuyen la contaminación del medio ambiente con fosfato [Wodzinski R. J., Ullah A.

- 20 H. *Adv. Appl. Microbiol.* 42, 263-302 (1996)].

Se han descrito en la bibliografía una serie de fitasas de origen fúngico [Wyss M. et al. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (2), 367-373 (1999); Berka R. M. et al. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (11), 4423-4427 (1998); Lassen S. et al. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (10), 4701-4707 (2001)] y bacteriano [Greiner R. et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 303 (1), 107-113 (1993); Kerovuo et al. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (6), 2079-2085 (1998); Kim H. W et al. *Biotechnol. Lett.* 25, 1231-1234 (2003);

- 25 Greiner R. et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 341 (2), 201-206 (1997); Yoon S. J. et al. *Enzyme and Microbial Technol.* 18, 449-454 (1996); Zinin N. V. et al. *FEMS Microbiol. Lett.*, 236, 283-290 (2004)].

Sin embargo, hasta la fecha, ninguna de estas fitasas muestra las propiedades requeridas para el uso eficaz como un complemento del pienso para consumo animal. En particular, las fitasas fúngicas tienden a ser proteolíticamente inestables [Igbasan F. A. et al. *Arch. Anim. Nutr.* 53, 353-373 (2000)] y, por lo tanto, susceptibles a la degradación,

- 30 mientras que la mayor parte de las fitasas bacterianas tienen una especificidad de sustrato muy restringida solo al fitato y degradan mal los inositol-fosfatos con grados de fosforilación intermedios [Greiner R. et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 303 (1), 107-113 (1993); Kerovuo J. et al. *Biochem. J.* 352, 626-628 (2000)].

UNIPROT: Q6U677. El n.º de acceso de la base de datos Q6U677 de 5 julio de 2004 se refiere a la fitasa XP002391879.

- 35 La patente internacional WO2004/015084 se refiere a las enzimas mutantes de la fitasa appA de *E. coli* y a las variantes naturales de la misma, a los ácidos nucleicos que codifican tales enzimas fitásicas, a los vectores y células hospedadoras que las llevan incorporadas, y a los métodos para fabricarlas y usarlas.

La patente internacional WO 2004/085638 se refiere a la fitasa producida por *Citrobacter braakii*.

- 40 El n.º de acceso PREV200300308051 de Zinin N. V. et al. de la base de datos se refiere a la actividad fitásica de varios grupos de bacterias.

Vats Purva et al. se refiere a estudios de producción y propiedades catalíticas de las fitasas (mioinositolhexakisfosfato fosfohidrolasas): una perspectiva general.

Por consiguiente, se necesitan fitasas mejores.

## COMPENDIO DE LA INVENCION

- 45 En un aspecto amplio, la presente descripción se refiere a las fitasas procedentes de una bacteria y a formas modificadas de las mismas. En particular, la descripción se refiere a las fitasas procedentes de la bacteria *Buttiauxella sp.* y a las variantes/formas modificadas de las mismas seleccionadas y/o modificadas genéticamente para mejorar las características en comparación con la enzima de tipo salvaje (enzima madre).

La presente descripción resulta ventajosa ya que da a conocer fitasas nuevas que tienen propiedades que las hacen particularmente útiles y eficaces como enzimas para piensos. En particular, la descripción se refiere a polipéptidos de fitasas nuevas purificadas y/o aisladas tal y como se describe en la presente memoria, o un fragmento funcional, o variantes o formas modificadas de la misma, o una forma modificada de la misma. La descripción también da a conocer  
5 la secuencia de ácido nucleico que codifica dicha fitasa.

Para ser eficaz como un aditivo enzimático para alimentos o para piensos para consumo animal, la fitasa tiene que reunir una serie de propiedades diferentes. Para poder degradar el ácido fítico en el medio ácido del estómago de un animal, tiene que ser activa a pH bajo, preferentemente a lo largo un intervalo amplio de valores de pH. Además, tiene que tener una actividad específica elevada y preferentemente una termoestabilidad elevada para permitir que la proteína  
10 aguante las temperaturas elevadas que con frecuencia se utilizan para la preparación productos alimentarios para consumo animal tales como los piensos granulados.

También es importante que la enzima tenga una amplia especificidad de sustrato que le permita hidrolizar no sólo el fitato, sino también los productos intermedios de la degradación del fitato, tal como los inositol-pentafosfatos, -tetrafosfatos y -trifosfatos. Los estudios sobre la degradación del fitato en los cerdos demuestran que estos inositol-  
15 oligofosfatos permanecerían, si no, muy insolubles en el intestino delgado y en el intestino grueso y, por lo tanto, inaccesibles para las fosfatasa alcalinas producidas por el animal y la microflora intestinal [Schlemmer U. et al., *Arch. Anim. Nutr.* 55, 255-280 (2001)]. Se han identificado variaciones en el perfil de especificidad del sustrato de diferentes enzimas. Por ejemplo, los inositol-trifosfatos generados por la fitasas de *B. subtilis* son esencialmente resistentes a la hidrólisis adicional por esta enzima [Kerovuo J. et al. *Biochem. J.* 352, 623-628 (2000)].

20 En otro aspecto de la descripción, se da a conocer un plásmido o sistema de vector, o un organismo transformado o transgénico que comprende una nueva fitasa como la descrita en la presente memoria o una forma modificada de la misma.

En otro aspecto, la presente descripción se refiere a organismos transgénicos modificados para que expresen una nueva fitasa como la descrita en la presente memoria o una forma modificada de la misma, y por lo tanto son capaces  
25 de producir una fitasa. La presente descripción da a conocer más medios y métodos para la producción biotecnológica de las fitasas y su uso como complementos para los piensos.

En las reivindicaciones se presentan los aspectos de la presente invención y se explican en el comentario siguiente.

Para facilitar la consulta, éstos y otros aspectos de la presente descripción se explican ahora en los encabezados de apartados adecuados. No obstante, las enseñanzas que contiene cada apartado no se limitan necesariamente a cada  
30 apartado particular.

Tal y como se utiliza con referencia a la presente invención, la terminología «producir», «que produce», «producido», «producible» y «producción» son sinónimos de los términos correspondientes «preparar», «que prepara», «preparado», «preparación», «generado», «generación» y «preparable».

Tal y como se utiliza con referencia a la presente invención, la terminología «expresión», «expresa», «expresado» y  
35 «expresable» son sinónimos de los términos correspondientes «transcripción», «transcribe», «transcrito» y «transcribible».

Tal y como se utiliza con referencia a la presente invención, la terminología «transformación» y «transfección» se refieren a un método para introducir secuencias de ácido nucleico en hospedadores, células hospedadoras, tejidos u  
órganos.

40 Otros aspectos que se refieren a secuencias nucleotídicas que se pueden utilizar en la presente invención incluyen: una construcción que comprende las secuencias de la presente invención; un vector que comprende las secuencias a utilizar en la presente invención; un plásmido que comprende las secuencias a utilizar en la presente invención; una célula transformada que comprende las secuencias a utilizar en la presente invención; un tejido transformado que comprende las secuencias a utilizar en la presente invención; un órgano transformado que comprende las secuencia a utilizar en la  
45 presente invención; un huésped transformado que comprende las secuencias a utilizar en la presente invención; un organismo transformado que comprende las secuencias a utilizar en la presente invención. La presente invención también abarca los métodos para expresar la secuencia nucleotídica a utilizar en la presente invención usando lo anterior, tal como la expresión en una célula hospedadora; que incluye métodos para transferir lo anterior. La presente descripción abarca además los métodos para aislar la secuencia nucleotídica, tal como aislarla de una célula  
50 hospedadora.

Otros aspectos que hacen referencia a las secuencias de aminoácidos a utilizar en la presente invención incluyen: una construcción que codifica las secuencias de aminoácidos a utilizar en la presente invención; un vector que codifica las secuencias de aminoácidos a utilizar en la presente invención; un plásmido que codifica las secuencias de aminoácidos a utilizar en la presente invención; una célula transformada que expresa las secuencias de aminoácidos a utilizar en la

presente invención; un tejido transformado que expresa las secuencias de aminoácidos a utilizar en la presente invención; un órgano transformado que expresa las secuencias de aminoácidos a utilizar en la presente invención; un huésped transformado que expresa las secuencias de aminoácidos a utilizar en la presente invención; un organismo transformado que expresa las secuencias de aminoácidos a utilizar en la presente invención. La presente invención también abarca los métodos para purificar la secuencia de aminoácidos a utilizar en la presente invención usando lo anterior, tal como expresión en una célula hospedadora; que incluye los métodos para transferir lo anterior y entonces purificar dicha secuencia.

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra el análisis por electroforesis en gel de acrilamida con SDS de la fitasa recombinante de *Buttiauxella* P1-29 purificada por cromatografía en DEAE-Sepharose. La figura presenta la señal escaneada de una imagen fotográfica digital de la calle que contiene una muestra de la fitasa de *Buttiauxella*.

La figura 2 muestra el perfil de pH de la fitasa de *Buttiauxella* P1-29.

La figura 3 muestra la especificidad de sustrato de la fitasa recombinante purificada de *Buttiauxella* P1-29 con fracciones de inositol-fostato con diferentes grados de fosforilación y sustratos modelo. Abreviaturas: IP6: ácido fítico; IP5, IP4 e IP3: mezclas de inositol-penta-, -tetra- y -trifosfatos isómeros, respectivamente; Fru P2: fructosa 1,6-difosfato; Fru P1: fructosa 6-fosfato.

La SEQ ID n.º 1 recoge la secuencia obtenida para la identificación de la cepa bacteriana.

La SEQ ID n.º 2 recoge la secuencia polinucleotídica que comprende el gen de la fitasa de *Buttiauxella* P1-29.

La SEQ ID n.º 3 recoge la secuencia de aminoácidos del gen de la fitasa de *Buttiauxella* P1-29.

### 20 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La invención se describe en los párrafos numerados siguientes.

1. Polipéptido seleccionado entre el grupo que consiste en:

- un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID n.º 3 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad del 80% con ésta;

25 - un polipéptido obtenible de la cepa P1-29 de *Buttiauxella* sp. depositada con el número de acceso NCIMB 41248;

- un polipéptido obtenible mediante la expresión de la SEQ ID n.º 2 o una secuencia nucleotídica obtenible de la cepa P1-29 de *Buttiauxella* sp. depositada con el número de acceso NCIMB 41248 o una secuencia nucleotídica que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80% con ésta; y

30 - un polipéptido obtenible de la cepa P1-29 de *Buttiauxella* sp. depositada con el número de acceso NCIMB 41248 y en la que el péptido es obtenible por la expresión de la SEQ ID n.º 2 o una secuencia nucleotídica obtenible de la cepa P1-29 de *Buttiauxella* sp. depositada con el número de acceso NCIMB 41248 o una secuencia nucleotídica que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80% con ésta,

35 en el que dicho polipéptido tiene una actividad fitasa, en el que dicho polipéptido tiene una actividad específica de al menos 300 U/mg, en el que dicha actividad específica se determina incubando dicho polipéptido en una solución que contiene fitato a 2 mM, CaCl<sub>2</sub> a 0,8 mM en tampón de acetato de sodio a 200 mM a pH 3,5, a una temperatura de 37 °C.

La presente descripción da a conocer una enzima que comprende la secuencia de aminoácidos que corresponde a la fitasa de *Buttiauxella* sp. o una forma modificada, un homólogo, una variante, un equivalente funcional o un fragmento eficaz de la misma.

40 La terminología «fitasa» significa una proteína o polipéptido que es capaz de catalizar la hidrólisis de ésteres de ácido fosfórico, incluido el fitato, y liberar fosfato inorgánico. Algunas fitasas, además del fitato, son capaces de hidrolizar al menos algunos de los inositol-fosfatos con grados intermedios de fosforilación.

45 La terminología «que corresponde a la fitasa de *Buttiauxella* sp.» significa que la enzima no necesita haberse obtenido directamente de una cepa de *Buttiauxella* sp. En vez de eso, la enzima tiene preferentemente que tener las mismas características funcionales o la misma secuencia que la de la fitasa de *Buttiauxella* sp. Por ejemplo, la fitasa de *Buttiauxella* sp. puede ser una variante obtenida de una *Buttiauxella* sp., pero que no está presente de forma natural en las especies de *Buttiauxella*.

*Buttiauxella* spp. incluyen *Buttiauxella agrestis*, *Buttiauxella brennerae*, *Buttiauxella ferragutiae*, *Buttiauxella gaviniae*,

*Buttiauxella izardii*, *Buttiauxella noackiae*, *Buttiauxella warmboldiae*. Las cepas de las especies de *Buttiauxella* están disponibles de DSMZ, el Centro de Recursos Nacionales Alemán para Material Biológico. Las fitasas se identifican preferentemente de *Buttiauxella spp.* por los métodos descritos en la presente memoria, por ejemplo, por hibridación a la SEQ ID n.º 2. Las cepas de *Buttiauxella spp.* preferentes para aislar polipéptidos y/o polinucleótidos de la invención se recogen en los ejemplos.

La terminología «fitasa de tipo salvaje» o «de tipo salvaje» de acuerdo con la invención describe una enzima fitasa con una secuencia de aminoácidos encontrada en la naturaleza.

La terminología «variante de la enzima fitasa», «variante de la fitasa» o «variante» de acuerdo con la invención describe una enzima fitasa con una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de una fitasa madre, pero que difiere de ella en una o más sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos, que en conjunto se denominan «mutaciones». Se contempla que una variante de la enzima fitasa también puede ser una enzima fitasa madre para posteriores ciclos de métodos de preparación de variantes de la fitasa, tal como evolución molecular.

La terminología «polipéptido(s) homólogo(s)», de acuerdo con la presente invención, descritos también como «homólogos» en la presente memoria, describe polipéptidos, preferentemente enzimas fitásicas (a saber, «fitasas homólogas» o «enzimas homólogas») con una identidad de secuencia de más del 75% en comparación con una primera secuencia de aminoácidos de enzimas/fitasas/polipéptidos, que preferentemente tiene una homología de secuencia de al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%.

La terminología «equivalente funcional de la misma» significa que la enzima tiene que tener aproximadamente las mismas características funcionales que la fitasa de *Buttiauxella sp.* La terminología «forma modificada» o «variante» significa que se ha modificado la enzima a partir de su forma original, pero conserva las mismas características funcionales enzimáticas que la fitasa de *Buttiauxella sp.* En particular, la terminología «variante» o «forma modificada» abarca enzimas fitásicas con una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de la fitasa madre/de tipo salvaje y que tiene una o más sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos, que en conjunto se denominan mutaciones. Las formas modificadas o las variantes pueden mostrar unas características enzimáticas alteradas en comparación con la enzima madre. Preferentemente, las formas modificadas o las variantes tienen uno o más de los fenotipos mejorados siguientes: aumento de la termoestabilidad y/o; un aumento de la estabilidad proteolítica (por ejemplo, frente a la pepsina) y/o; un aumento de la actividad específica y/o; una especificidad de sustrato más amplia y/o; una actividad a lo largo de un intervalo de pH más amplio. La terminología fragmento «funcional» o «eficaz» significa un fragmento o porción de la fitasa de *Buttiauxella sp.* que conserva aproximadamente la misma función enzimática o el mismo efecto.

Preferentemente, la enzima fitasa de este aspecto de la presente descripción tiene la misma secuencia o una secuencia que es idéntica (homóloga) de al menos el 75% con la de la fitasa de *Buttiauxella sp.*

Convenientemente, la enzima comprende la secuencia de aminoácidos como la mostrada en la SEQ ID n.º 3 o una secuencia que tiene una identidad (homología) de al menos el 75% con ésta o un fragmento funcional de la misma. En una realización preferente, la descripción proporciona un polipéptido aislado y/o purificado que tiene la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID n.º 3 o una secuencia que tiene una identidad (homología) de al menos el 75% con éste o un fragmento eficaz del mismo. Cuando nos referimos a la SEQ ID n.º 3 y a los polipéptidos que comprenden la SEQ ID n.º 3, se contempla que también se refiera a los polipéptidos que se procesan co- o postraduccionalmente durante la expresión, por ejemplo, por escisión del péptido señal. La escisión postraduccional también se puede producir en el extremo carboxilo. Por consiguiente, en una realización preferente, el fragmento eficaz del mismo (también denominado fragmento funcional del mismo) es el polipéptido maduro producido por el hospedador nativo o un hospedador adecuado para la expresión apropiada.

En otra realización, la fitasa se caracteriza por que procede de la cepa P1-29 de *Buttiauxella sp.* depositada con el número de acceso NCIMB 41248.

En una realización preferente, la descripción se refiere a una fitasa de acuerdo con una realización cualquiera del primer aspecto de la descripción que comprende una o más mutaciones en las posiciones siguientes (numeración de acuerdo con la numeración en la SEQ ID n.º 3):

59, 70, 122, 125, 167, 193, 197, 204, 209, 211, 221, 223, 225, 240, 242, 244, 268, 281, 289, 294, 303, 336, 351

Estas posiciones se caracterizan por que la mutagénesis de la enzima en estas posiciones conduce a una mejora de las características enzimáticas deseadas.

Las sustituciones siguientes pueden ser variantes preferentes:

K 59 A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y

T 70 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, o Y

- A 122 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y  
 D 125 A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y  
 T 167 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, o Y  
 H 193 A, C, D, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y  
 5 F 197 A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y  
 T 204 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, o Y  
 T 209 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, o Y  
 A 211 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y  
 S 221 A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y  
 10 D 223 A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y  
 S 225 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, o Y  
 K 240 A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y  
 A 242 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y  
 D 244 A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y  
 15 A 268 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y  
 S 281 A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y  
 Q 289 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, o Y  
 A 294 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y  
 N 303 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, o Y  
 20 I 336 A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y  
 N 351 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, o Y

Con «mutaciones conservativas» se hace referencia a los restos de aminoácidos que son conservativos en términos de las características de los aminoácidos en comparación con el resto aminoacídico indicado. Las características aminoacídicas incluyen el tamaño del resto, la hidrofobia, la polaridad, la carga, el valor de pK y otras características aminoacídicas conocidas en la técnica. Las mutaciones conservativas preferentes se recogen más adelante como sustituciones conservativas.

En una realización particularmente preferente, las mutaciones se encuentran en una o más de las posiciones siguientes: K59; T167; K240; T167; K240; D244; Q289; T209 y F197. Las mutaciones preferentes en estas posiciones específicas se recogen más adelante, entre las que se incluyen las mutaciones más preferentes: K59E; T167V; K240T; T167I; 30 K240E; D244C; Q289Y; T209K y F197S.

En una realización preferente adicional, se da a conocer una fitasa que comprende una combinación de mutaciones seleccionada entre el grupo que consiste en:

- D125E/H193R;  
 A294E/N303K;  
 35 T167I/K240T;  
 D223E/K240E/N351D;  
 T167I/K240T/A294E/N303K;  
 T167I/K240E/A242S/A294E/N303K;  
 A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A294E/N303K;

A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A242S/S281L/Q289Y/A294E/N303K;

A122T/D125E/H193R/F197S/T209K/A211P/S221N/G225A/K240E/A294E/N303K;

D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K;

A122T/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K/I336F y

- 5 N70Y/D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K.

Por consiguiente, una fitasa preferente de acuerdo con la presente descripción es una variante que comprende la secuencia de aminoácidos recogida en la SEQ ID n.º 3 o un fragmento eficaz de la misma (o un homólogo de la misma, caracterizándose preferentemente la fitasa por proceder la cepa P1-29 de *Buttiauxella* sp. depositada con el número de acceso NCIMB 41248, o un homólogo de la misma), excepto por tener una o más de las mutaciones de aminoácido  
10 recogidas anteriormente o una de las combinaciones de las mutaciones recogidas anteriormente.

En estas realizaciones, la nomenclatura indica una fitasa que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID n.º 3 con las mutaciones indicadas por referencia a las posiciones de los aminoácidos de la SEQ ID n.º 3. La nomenclatura se describe con más detalle más adelante.

15 Convenientemente, estas variantes muestran una mejora con respecto a alguna de las siguientes características: termoestabilidad, margen de pH, estabilidad frente a la pepsina, actividad específica, especificidad de sustrato y especificidad del sustrato más amplia. Los métodos adecuados para determinar estas características se describen en la presente memoria.

20 En particular, las mejoras de las características de la fitasa se dirigen a la estabilidad de la enzima en condiciones de procesamiento de alimentos y piensos, a la estabilidad de la enzima durante el tránsito por el estómago, y a la actividad y estabilidad de la enzima en el estómago humano o animal y/o el tubo digestivo, que hacen que las variantes mejoradas sean particularmente adecuadas para utilizarlas como complementos de los piensos. Por lo tanto, tales mejoras comprenden, entre otros parámetros, el aumento de la termoestabilidad a temperaturas elevadas, preferentemente a temperaturas por encima de los 65°C, el aumento en la estabilidad frente a la digestión proteolítica, preferentemente frente a las proteasas del tubo digestivo tal como la pepsina, el aumento de la actividad catalítica a pH  
25 bajos, preferentemente de la actividad catalítica por debajo de pH 5,5, y la eficacia general de la liberación de grupos fosfato desde el fitato, y preferentemente además inositol-fosfatos.

#### Nomenclatura

30 En la presente descripción y reivindicaciones, se utilizan los códigos de una letra y tres letras convencionales para los restos de los aminoácidos. Para facilitar la consulta, las mutaciones en las variantes enzimáticas se describen mediante el uso de la nomenclatura siguiente: resto aminoácido en la enzima madre; posición; resto(s) aminoácido(s) sustituyente(s). Según esta nomenclatura, la sustitución de, por ejemplo, un resto de alanina por un de resto glicina en la posición 20 se indica como Ala20Gly o A20G. La detección de la alanina en la misma posición se muestra como Ala20\*o A20\*. La inserción de un resto aminoácido adicional (por ejemplo, glicina) se indica como Ala20AlaGly o A20AG. La delección de un fragmento de restos de aminoácidos consecutivos (por ejemplo, entre alanina en la posición  
35 20 y glicina en la posición 21) se indica como Δ(Ala20-Gly21) o Δ(A20-G21). Cuando una secuencia de enzima madre contiene una delección en comparación con la secuencia enzimática utilizada para numerar una inserción en tal posición (por ejemplo, una alanina en la posición 20 deleccionada) se indica como \*20Ala o \*20A. Cuando hay varias mutaciones, se separan por un signo más o una barra inclinada. Por ejemplo, dos mutaciones en las posiciones 20 y 21 que sustituyen alanina y ácido glutámico por glicina y serina, respectivamente, se indican como A20G+E21S o A20G/E21S.

40 Cuando un resto de aminoácido en una posición determinada se sustituye por dos o más restos de aminoácidos alternativos, estos restos están separados por una coma o por una barra inclinada. Por ejemplo, la sustitución de la alanina en la posición 30 por glicina o ácido glutámico se indica como A20G,E o A20G/E, o A20G, A20E. Cuando una posición adecuada para la modificación se identifica en la presente memoria sin que se le sugiera ninguna modificación específica, se debe entender que cualquier resto de aminoácido se puede ser sustituto del resto de aminoácido presente  
45 en la posición. Así, por ejemplo, cuando una modificación de una alanina en la posición 20 se menciona pero no se especifica, se debe entender que la alanina se puede deleccionar o sustituir por cualquier otro resto de aminoácido (a saber, cualquiera entre R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V).

50 Convenientemente, la fitasa o el equivalente funcional de la presente invención se caracteriza por tener dicha fitasa una actividad específica de al menos 100 U/mg o 200 U/mg, preferentemente al menos 300 U/mg, donde dicha actividad específica se determina al incubar dicha fitasa en un solución que contiene fitato a 2 mM, CaCl<sub>2</sub> a 0,8 mM en tampón de acetato de sodio a 200 mM a pH 3,5 tal y como se detalla en el ejemplo 1. La fitasa de la presente descripción o el equivalente funcional de la misma también se puede caracterizar adecuadamente por tener dicha fitasa una actividad máxima en torno a pH 4 a 4,5, donde dicha actividad se determina al incubar dicha fitasa en una solución que contiene fitato a 2 mM, CaCl<sub>2</sub> a 0,8 mM en tampón de acetato de sodio a 200 mM. La fitasa de la presente descripción también

se puede caracterizar adecuadamente por tener dicha fitasa el 40% o más de una actividad máxima observada a pH 2,5 y 5,5, en la que se utiliza el tampón de hidrocloreuro de glicina para determinar la actividad a pH 2,5.

- Convenientemente, en una realización, la fitasa o un equivalente funcional de la presente descripción se caracteriza por tener dicha fitasa una actividad específica de 330 U/mg o mayor, donde dicha actividad específica se determina al
- 5 incubarse dicha fitasa en una solución que contiene fitato a 2 mM,  $\text{CaCl}_2$  a 0,8 mM en tampón de acetato de sodio a 200 mM a pH 3,5. En otra realización, la fitasa de la presente descripción o un equivalente funcional de la misma se puede caracterizar adecuadamente también por tener dicha fitasa dos máximos de actividad en torno a pH 3 y a pH 4 a 4,5, donde dicha actividad se determina al incubarse dicha fitasa en una solución que contiene fitato a 2 mM,  $\text{CaCl}_2$  a 0,8 mM en tampón de acetato de sodio a 200 mM.
- 10 En otro aspecto, la descripción da a conocer una molécula de ácido nucleico aislada y/o purificada o secuencia nucleotídica que codifica la enzima que comprende la secuencia de aminoácidos que corresponde a la fitasa de *Buttiauxella sp.*, o un homólogo de la misma. Convenientemente, dicha molécula de ácido nucleico aislada y/o purificada codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID n.º 3 o una secuencia que tiene una identidad (homología) de al menos el 75% con ésta o un fragmento eficaz de la misma. En una
- 15 realización, la molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido que comprende la SEQ ID n.º 3 e incluye mutaciones en las posiciones preferentes recogidas en la presente memoria o en alguna de las mutaciones específicas o combinaciones de mutaciones recogidas en la presente memoria. En otra realización, la descripción da a conocer una molécula de ácido nucleico aislada y/o purificada que comprende una secuencia de nucleótidos que es la misma que la de la SEQ ID n.º 2, o que es complementaria a ella, o que contiene algunas sustituciones de codones adecuadas para
- 20 cualquiera de los de la SEQ ID n.º 2, o que comprende una secuencia que tiene una homología de secuencia de al menos el 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la SEQ ID n.º 2.

Aún en otro aspecto más, la descripción se refiere a una secuencia de nucleótidos y al uso de una secuencia de nucleótidos mostrada como:

- a) la secuencia de nucleótidos presentada como la SEQ ID n.º 2,
- 25 b) una secuencia de nucleótidos que es variante, homólogo, derivado o fragmento de la secuencia de nucleótidos presentada como la SEQ ID n.º 2;
- c) una secuencia de nucleótidos que es el complemento de la secuencia de nucleótidos presentada en la SEQ ID n.º 2;
- d) una secuencia de nucleótidos que es el complemento de un variante, homólogo, derivado o fragmento de la secuencia de nucleótidos presentada como la SEQ ID n.º 2;
- 30 e) una secuencia de nucleótidos que es capaz de hibridarse a la secuencia nucleotídica presentada en la SEQ ID n.º 2;
- f) una secuencia de nucleótidos que es capaz de hibridarse a variante, homólogo, derivado o fragmento de la secuencia de nucleótidos presentada como la SEQ ID n.º 2;
- g) una secuencia de nucleótidos que es el complemento de una secuencia de nucleótidos que es capaz de hibridarse a la secuencia de nucleótidos presentada en la SEQ ID n.º 2;
- 35 h) una secuencia de nucleótidos que es el complemento de una secuencia de nucleótidos que es capaz de hibridarse a variante, homólogo, derivado o fragmento de la secuencia de nucleótidos presentada como la SEQ ID n.º 2;
- i) una secuencia de nucleótidos que es capaz de hibridarse al complemento de la secuencia de nucleótidos presentada en la SEQ ID n.º 2;
- 40 j) una secuencia de nucleótidos que es capaz de hibridarse al complemento de variante, homólogo, derivado o fragmento de la secuencia de nucleótidos presentada como la SEQ ID n.º 2.

Se considera que un nucleótido se hibrida a uno de los nucleótidos anteriores (e), (f), (g), (h), (i) o (j) si es capaz de hibridarse en condiciones de rigor medio, más preferentemente de rigor elevado, incluso más preferentemente en condiciones muy rigurosas.

- Para preparar una transferencia para hibridación, se pueden utilizar los protocolos de biología molecular estándares de
- 45 transferencia (por ejemplo, transferencia Southern para hibridaciones de ADN). La cantidad del ADN diana depende de la abundancia relativa de la secuencia diana. Si se utiliza una secuencia diana pura, se prefieren entre 1 y 5 pg de ADN por kilobase de polinucleótidos. Típicamente, el límite de detección es de unos 0,5 pg de ADN para una sonda radiactiva con una actividad específica de  $10^9$  dpm/mg, que es equivalente a un gen en una sola copia de 500 pb de largo en 3,3 mg de ADN genómico de un genoma complejo (por ejemplo, humano). En la práctica se utilizarán aproximadamente 10
- 50 mg de ADN genómico, por ejemplo para seleccionar organismos, tales como microorganismos, que contienen un polinucleótido que codifica una fitasa de la invención. Si el ADN diana es bacteriano, o por ejemplo un plásmido, habrá

- que diluir el ADN consecuentemente para evitar la sobreexposición. El ADN diana se transfiere, por ejemplo, mediante transferencia puntiforme, o mediante transferencia a partir de un gel de electroforesis. Las condiciones preferentes se describen en «Membrane Transfer and Detection Methods» (Amersham International plc, Reino Unido, PI/162/85/1). Se utiliza preferentemente una membrana de nilón cargada positivamente Hybond N+ (Amersham Life Science). La sonda se prepara preferentemente según el kit de marcación Ready to GO DNA<sup>TM</sup> de Pharmacia para preparar una sonda de  $> 1 \times 10^9$  dpm/ $\mu$ g. Se utiliza la sonda en el tampón de hibridación a una concentración de  $1 \times 10^6$  dpm/ml de tampón de hibridación. Las transferencias se prehibridan preferentemente en tampón de hibridación (SSC a 6X, solución de Denhardt a 5X, y SDS al 0,5%, y ADN de esperma de salmón desnaturalizado a 100 mg/ml de tampón) durante una hora a 65 °C, y luego se hibrida en tampón de hibridación que contiene la sonda marcada desnaturalizada con agitación durante 12 horas a 65 °C. Entonces se lava la transferencia con un volumen adecuado (normalmente 50 ml) de tampón de lavado en SSC a 2X y SDS al 0,1% durante 30 minutos a 65 °C, seguido de un segundo lavado en un volumen adecuado (normalmente 50 ml) de tampón de lavado en el mismo tampón de lavado (SSC a 2X, SDS al 0,1%) para un lavado de rigor medio, o en SSC al 0,1X, SDS al 0,1% durante 10 minutos a 65 °C (rigor elevado), pudiéndose repetir el segundo lavado a 70 °C para un lavado muy riguroso.
- 15 La secuencia nucleotídica de la presente descripción puede comprender secuencias que codifican la SEQ ID n.º 3 o un fragmento eficaz de la misma o una variante, forma modificada, homólogo o derivado de la misma.

- En particular, la descripción da a conocer un plásmido o sistema de vector que comprende una fitasa como la descrita en la presente memoria o un homólogo o derivado de la misma. Preferentemente, el plásmido o sistema de vector comprende una secuencia de ácido nucleico como la presentada en la SEQ ID n.º 2 o una secuencia que es homóloga al menos al 75% con ésta o un fragmento eficaz de la misma. Convenientemente, el plásmido o sistema de vector es un vector de expresión para la expresión de cualquiera de las enzimas codificadas por una secuencia de ácido nucleico como la presentada en cualquiera de la SEQ ID n.º 2 o una secuencia que es homóloga (idéntica) al menos al 75% con ésta en un microorganismo. Los vectores de expresión adecuados se describen en la presente memoria. Además, la descripción da a conocer un plásmido o sistema de vector para la expresión de cualquiera de las enzimas modificadas o variantes o fragmentos funcionales descritos en la presente memoria. Los vectores de expresión adecuados se describen en la presente memoria.

#### Variantes de la fitasa

La presente invención está diseñada para mejorar las características de una fitasa madre mediante la modificación de uno o más restos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la fitasa madre.

- 30 Las enzimas fitasa usadas como enzimas originales de acuerdo con la presente invención incluyen fitasas de tipo salvaje de bacterias, en particular, preferentemente, fitasas que se obtienen de *Buttiauxella sp.*, o que proceden de ella, que tienen la secuencia de aminoácidos como la mostrada en la SEQ ID n.º 3 o un fragmento eficaz de la misma, o una secuencia de aminoácidos con una identidad con la SEQ ID n.º 3 de más del 75%, preferentemente de más del 80%, más preferentemente de más del 90%, incluso más preferentemente de más del 95%, 96%, 97%, 98%, preferentemente de más del 99% (a saber, polipéptido homólogo) o un fragmento eficaz de la misma.

- Las variantes enzimáticas mejoradas de la fitasa de la descripción tienen preferentemente una identidad con la SEQ ID n.º 3 o con un fragmento eficaz de más del 75%, preferentemente de más del 80%, más preferentemente de más del 90%, más preferentemente de más del 95%, 96%, 97%, 98%, preferentemente de más del 99%. No obstante, también se contempla que las variantes puedan ser heterólogas (a saber, no homólogas) a la SEQ ID n.º 3. Por ejemplo, las variantes producidas mediante las técnicas de recombinación tales como la recombinación exomediada, o el barajado de familias, pueden dar lugar a variantes, aunque si se preparan utilizando la fitasa madre de acuerdo con la presente descripción, pueden tener una homología de menos del 75%.

- Los alineamientos de secuencia así como la determinación de las identidades de secuencia se pueden realizar adecuadamente por medio de programas informáticos conocidos en la técnica, tales como GAP [Needleman, S. B. y Wunsch, C. D. (1970), *Journal of Molecular Biology*, 48, pág. 443-453] contenido en el paquete de programas GCG. Se puede utilizar GAP con los ajustes siguientes para la comparación de secuencias de polipéptidos: penalización de 3,0 para la creación de huecos, y penalización de 0,1 para la extensión de los huecos. Los alineamientos de secuencias se utilizan, por ejemplo, para determinar las posiciones que se corresponden en los polipéptidos homólogos.

- Las enzimas fitasa se caracterizaron después de la expresión heteróloga en uno o más de los hospedadores de expresión siguientes: *Escherichia coli* K12; *Bacillus subtilis*; *Saccharomyces cerevisiae*. Se pueden utilizar otros hospedadores de expresión.

- Las mejoras de las características de la fitasa de acuerdo con la presente invención se dirigen al uso en procesamiento de los alimentos y de los piensos, así como para el uso como un aditivo para los alimentos y los piensos. En particular, las mejoras se dirigen a la estabilidad en las condiciones de procesamiento de los alimentos y de los piensos, a la estabilidad durante el tránsito por el estómago, y a la actividad y estabilidad en el estómago y/o en el tubo digestivo humano o animal. Tales mejoras comprenden, entre otros parámetros, el aumento de la termoestabilidad a

temperaturas elevadas, preferentemente a temperaturas por encima de 65 °C, el aumento en la estabilidad frente a la digestión proteolítica, preferentemente frente a las proteasas del tubo digestivo, el aumento en la actividad catalítica a pH bajo, preferentemente de la actividad catalítica por debajo de pH 5,5, y a la eficacia general de la liberación de grupos fosfato a partir del fitato.

- 5 El aumento de la termoestabilidad a temperaturas elevadas se valora mediante la temperatura de inactivación de la enzima. La temperatura de inactivación se define como la temperatura a la que la actividad residual de una enzima fitasa después de la incubación durante una duración determinada y el enfriamiento posterior a temperatura ambiente es el 50% de la actividad residual de la misma enzima fitasa incubada durante el mismo tiempo en las mismas condiciones a temperatura ambiente. Las diferencias de termoestabilidad son las diferencias en °C entre la temperatura de inactivación de las dos enzimas.

- 10 Las posiciones y/o las regiones a mutar para obtener una mejora de las características se encontraron mediante el análisis de la secuencia y de la estructura de las fitasas de tipo salvaje, así como mediante mutagénesis de las enzimas madre, en particular, mediante la introducción de mutaciones en la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje como la expuesta en la SEQ ID n.º 3, y la selección de las variantes de la enzima con unas características mejoradas. Por lo tanto, se han identificado algunas regiones, así como las posiciones dentro de las enzimas madre, que eran significativas para que se mejoren las características de las enzimas fitásicas.

Por lo tanto, la descripción se refiere a las variantes de la fitasa con una mejora de las características que, cuando se comparan con la fitasa madre, comprenden mutaciones en una o más de las posiciones siguientes (numeración de acuerdo con la numeración en la SEQ ID n.º 3):

- 20 59, 70, 122, 125, 167, 193, 197, 204, 209, 211, 221, 223, 225, 240, 242, 244, 268, 281, 289, 294, 303, 336, 351.

y/o en las posiciones correspondientes en una fitasa homóloga a la fitasa tal como se muestra en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 3. Estas posiciones se caracterizan porque la mutagénesis de estas posiciones conducen a una mejora de las características de las enzimas.

K59E; T167V; K240T; T167I; K240E; D244C; Q289Y; T209K y F197S.

- 25 o mutaciones conservativas en cada posición.

Las combinaciones preferentes específicas de las mutaciones incluyen:

D125P/H193R;

A294E/N303K;

T167I/K240T;

- 30 D223F/K240E/N351D;

T167I/K240T/A294E/N303K;

T167I/K240E/A242S/A294E/N303K;

A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A294E/N303K;

A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A242S/S281L/Q289Y/A294E/N303K;

- 35 A122T/D125E/H193R/F197S/T209K/A211P/S221N/G225A/K240E/A294E/N303K;

D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K;

A122T/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K/I336F y

N70Y/D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K.

#### 40 Métodos para preparar las variantes de la fitasa

En una realización amplia, la descripción da a conocer métodos para preparar la(s) variante(s) de la enzima fitasa.

En una realización preferente, el método para preparar una variante de la enzima fitasa comprende las etapas consecutivas siguientes:

- 5 a) Seleccionar al menos una enzima fitasa madre, en la que al menos una enzima fitasa madre se selecciona entre i) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que corresponde a una fitasa de *Buttiauxella sp.*, o una forma modificada, un polipéptido homólogo, una variante, un equivalente funcional o un fragmento eficaz, de la misma, como la descrita en la presente memoria, o ii) al menos una variante de la enzima fitasa como la descrita en la presente memoria;
- b) Generar al menos una variante de la fitasa mediante la introducción de al menos una alteración de dicha enzima fitasa madre que es una inserción, una delección o una sustitución o una combinación de las mismas, de un resto de aminoácido en dicha enzima fitasa madre para obtener al menos una variante de la enzima fitasa;
- 10 c) Detectar selectivamente al menos una dicha variante de la enzima fitasa para identificar una variante enzimática mejorada de la fitasa, que en comparación con la enzima fitasa madre, tiene una mejora en una propiedad o las propiedades seleccionadas entre:
- i. mayor termoestabilidad y/o
- ii. actividad específica y/o
- iii. estabilidad proteolítica
- 15 d) Preparar dicha variante mejorada de la enzima fitasa, preferentemente para producir una variante de la enzima fitasa aislada y/o purificada.

En una realización preferente, durante la etapa b) se genera una población de variantes de la enzima fitasa y en la etapa c) se detecta selectivamente al menos una proporción de dicha población de variantes de la enzima fitasa.

- 20 En una realización preferente, la etapa a) comprende someter a mutagénesis una secuencia nucleotídica de acuerdo con las reivindicaciones 11 a 13 que codifica una enzima fitasa madre, y la etapa b) comprende expresar la secuencia nucleotídica mutada obtenida en la etapa a) en una célula hospedadora, y la etapa c) comprende la detección selectiva de las células hospedadoras, o de extracto(s) de las mismas, en busca de una variante mejorada de la enzima fitasa con mejora de dicha propiedad o propiedades.

- 25 En una realización adicional después de la etapa c), y optativamente la d), comprende adicionalmente al menos un ciclo ulterior de repetición de las etapas a) a c) y optativamente d), en la que, preferentemente, en dicho(s) ciclo(s) posterior(es), la al menos una enzima fitasa madre de la etapa a) se selecciona entre dicha al menos una variante de la enzima fitasa y/o una variante mejorada de la fitasa preparada de acuerdo con el método.

- 30 En otra realización preferente más, la etapa c) comprende la detección selectiva de las células hospedadoras que expresan una variante mejorada de la enzima fitasa, que cuando se compara o bien con i) dicha enzima fitasa madre y/o bien ii) un polipéptido que comprende la SEQ ID n.º 3 o un fragmento funcional de la misma, tiene una diferencia de termoestabilidad de al menos 2,5.

- 35 En una realización adicional, la etapa c) comprende la detección selectiva de las células hospedadoras que expresan una variante mejorada de la enzima fitasa, que cuando se compara con o bien i) dicha enzima fitasa madre y/o bien ii) un polipéptido que comprende la SEQ ID n.º 3 o un fragmento funcional de la misma, tiene la estabilidad frente a la pepsina de al menos 30.

En una realización adicional, la etapa c) comprende la detección selectiva de las células hospedadoras que expresan una variante mejorada de la enzima fitasa, que cuando se compara con o bien i) dicha enzima fitasa madre y/o bien ii) un polipéptido que comprende la SEQ ID n.º 3, tiene una proporción de actividad específica cuando se compara con la fitasa codificada por la SEQ ID n.º 3 de al menos 110.

- 40 La descripción también da a conocer un método para preparar una variante de la enzima fitasa, cuyo método comprende:

- a) Seleccionar una enzima fitasa madre, en la que la enzima fitasa madre se selecciona entre
- i. una enzima fitasa madre con una homología de al menos el 75% con la SEQ ID n.º 3 o un fragmento funcional de la misma
- 45 ii. una enzima fitasa madre obtenida de *Buttiauxella spp.*
- iii. al menos una variante de la enzima fitasa
- b) Realizar al menos una alteración que es una inserción, una delección o una sustitución de un resto de aminoácido en la enzima fitasa madre para obtener una variante de la enzima fitasa,

c) Detectar selectivamente una variante de la enzima fitasa que en comparación con la enzima fitasa madre tiene una mejora de las características, como se describe en la presente memoria, seleccionada preferentemente entre una o más de:

- i. mayor termoestabilidad y/o
- 5 ii. actividad específica y/o
- iii. estabilidad proteolítica y/o
- d) Preparar la variante de la enzima fitasa

Optativamente, al menos las etapas a) a c) se pueden repetir en uno o más ciclos posteriores (iterativos). Por lo tanto, se contempla que la enzima fitasa madre sea una variante de la enzima fitasa preparada mediante ciclos previos del método anterior a) a c).

En una realización adicional, la descripción da a conocer un método para preparar una variante de la fitasa, que comprende las etapas siguientes:

- a) proporcionar una enzima fitasa madre, seleccionada entre
  - i. una enzima fitasa con una homología de al menos el 75% con la SEQ ID n.º 3 o un fragmento funcional de la misma
  - 15 ii. una enzima fitasa obtenida de *Buttiauxella spp.*,
  - iii. al menos una variante de la enzima fitasa

b) generar una población de variantes de la fitasa mediante la alteración de la fitasa madre. Preferentemente, dicha(s) alteración(ones) se obtiene(n) mediante una inserción, una delección o una sustitución de al menos un resto de aminoácido en la fitasa madre, o cualquier combinación de las mismas.

20 c) rastrear selectivamente la población en busca de una variante de la fitasa que, en comparación con la enzima fitasa madre, tiene una mejora de las características, como las descritas en la presente memoria, seleccionadas preferentemente entre una o más de:

- i. mayor termoestabilidad y/o
- ii. mayor actividad específica y/o
- 25 iii. mayor estabilidad proteolítica,

d) seleccionar una o más variantes de la fitasa entre la población de fitasas.

e) optativamente, repetir las etapas a) a c) de forma cíclica, y preferentemente en las que las variantes de la fitasa seleccionadas en un ciclo se utilizan como fitasas de partida en el ciclo siguiente.

En una realización adicional, la descripción da a conocer un método para preparar una variante de la enzima fitasa, cuyo método comprende:

- a) Someter a mutagénesis la secuencia nucleotídica que codifica una enzima fitasa madre, donde la enzima fitasa madre se selecciona entre
  - i. una enzima fitasa madre con una homología de al menos el 75% con la SEQ ID n.º 3 o un fragmento funcional de la misma
  - 35 ii. una enzima fitasa madre obtenida de *Buttiauxella spp.*
  - iii. al menos una variante de la enzima fitasa

b) Expresar la secuencia nucleotídica mutada obtenida en la etapa (a) en una célula hospedadora, y

c) Detectar selectivamente las células hospedadoras que expresan una variante de la enzima fitasa que en comparación con la enzima fitasa madre tiene una mejora de las características, como las descritas en la presente memoria, seleccionada preferentemente entre una o más de:

- 40 i. mayor termoestabilidad y/o
- ii. mayor actividad específica y/o

iii. mayor estabilidad proteolítica y/o

d) Preparar la variante de la enzima fitasa expresada por la célula hospedadora

Optativamente, se pueden repetir las etapas a) a c), incluida optativamente la etapa d), en uno o más ciclos posteriores (iterativos).

5 En otra realización más, la descripción da a conocer un método para preparar una variante de la fitasa, que comprende las etapas siguientes:

a) Someter a mutagénesis una secuencia nucleotídica que codifica una enzima fitasa madre para generar una población de variantes con nucleótidos alterados, en la que, preferentemente, dicha(s) alteración(ones) se obtiene(n) mediante una inserción, una delección o una sustitución de al menos un resto de aminoácido en la fitasa madre, o cualquier combinación de las mismas, y en la que la enzima fitasa madre se selecciona entre

10

i. una enzima fitasa con una homología de al menos el 75% con la SEQ ID n.º 3 o un fragmento funcional de la misma

ii. una enzima fitasa obtenida de *Buttiauxella spp.*,

iii. al menos una variante de la enzima fitasa

b) Expresar la población de variantes nucleotídicas obtenidas en la etapa a) en una población de células hospedadoras correspondientes, y

15

c) Rastrear selectivamente la población en busca de una variante de la fitasa que en comparación con la enzima fitasa madre tiene una mejora de las características, como las descritas en la presente memoria, preferentemente seleccionada entre una o más de:

i. mayor termoestabilidad y/o

20 ii. mayor actividad específica y/o

iii. mayor estabilidad proteolítica,

d) Seleccionar una o más variantes de la fitasa de la población de fitasas.

e) optativamente, repetir las etapas a) a c) de forma cíclica, y preferentemente en las que las variantes de la fitasa seleccionadas en un ciclo se utilizan como fitasas iniciales en el ciclo siguiente.

25 Cuando sea adecuado, en los métodos anteriores de preparación de una variante de la enzima fitasa, dicha secuencia nucleotídica es preferentemente una secuencia de ADN.

La secuencia nucleotídica es preferentemente una molécula de ácido nucleico aislada y/o purificada o secuencia nucleotídica que codifica la enzima que comprende la secuencia de aminoácidos que corresponde a la fitasa de *Buttiauxella sp.*, o un homólogo de la misma como los descritos en la presente memoria.

30 La fitasa madre se selecciona preferentemente entre la SEQ ID n.º 3 o un fragmento funcional de la misma o un homólogo de la fitasa de *Buttiauxella sp.* como la descrita en la SEQ ID n.º 3 como se describe en la presente memoria.

En las realizaciones anteriores de la descripción, que se refieren a los métodos para preparar la variante de la enzima fitasa, la enzima/los nucleótidos fitasa madre que codifica la enzima/los nucleótidos fitasa madre es preferentemente una fitasa de tipo salvaje.

35 No obstante, en otra, la madre puede ser una variante preparada por ciclos previos de mutagénesis, por ejemplo. En una realización, los métodos para preparar las variantes de la enzima fitasa son iterativos, en los que las etapas a) a c) [incluida optativamente la etapa d)] se repiten al menos más de una vez. En tales realizaciones, el método de mutagénesis utilizados en el primer ciclo de mutagénesis es preferentemente la PCR propensa a los errores, más preferentemente la PCR en el umbral de error. Los ciclos posteriores también pueden ser de la PCR propensa a errores, más preferentemente de la PCR en el umbral de error, pero pueden ser alternativamente mutagénesis basada en la recombinación, en la que los grupos de al menos dos variantes mejoradas independientes se identifican en un primer ciclo de mutagénesis, durante un segundo o posterior ciclo de mutagénesis se hacen recombinar para dar al menos una variante recombinante (por ejemplo, utilizando los métodos de barajado de familias o de reacción en cadena de la recombinasa).

40 Al experto en la técnica le será evidente que también se pueden utilizar métodos de mutagénesis alternativos, que incluyen el diseño racional, la mutagénesis de detección de sitios o la mutagénesis inducida químicamente/por radiación.

45

En las realizaciones anteriores de la descripción, que se refieren a los métodos para preparar la variante de la enzima fitasa, la variante de la enzima fitasa se detecta selectivamente con preferencia por una mayor termoestabilidad.

5 En las realizaciones anteriores de la descripción, que se refieren a los métodos para preparar la variante de la enzima fitasa, la variante de la enzima fitasa se detecta selectivamente con preferencia por al menos un solo parámetro, seleccionado preferentemente entre mayor termoestabilidad, mayor estabilidad proteolítica o mayor actividad específica, más preferentemente la mayor termoestabilidad.

10 Preferentemente, la detección selectiva por dicho primer parámetro se realiza al menos en un primer ciclo de mutagénesis que comprende al menos las etapas a) a c), en las que c) comprende al menos la detección selectiva por dicho primer parámetro. Este primer ciclo de mutagénesis puede venir seguido luego por más ciclos (iterativos) de mutagénesis y selección que comprenden las etapas a) a c) [incluida optativamente la d)], en las que la selección en dichos ciclos adicionales se puede seleccionar entre el mismo parámetro de selección que se utilizó en la etapa c) de dicho primer ciclo, o alternativamente un parámetro diferente.

15 Durante los ciclos iterativos de los métodos anteriores para preparar una variante de la enzima fitasa, dicho primer parámetro se selecciona preferentemente entre mayor termoestabilidad, mayor estabilidad proteolítica o mayor actividad específica, más preferentemente la mayor termoestabilidad. Preferentemente, cuando se ha realizado un primer ciclo de mutagénesis para seleccionar variantes con una mayor termoestabilidad, durante uno o varios ciclos posteriores (iterativos) de mutagénesis que comprenden las etapas a) a c), dicho parámetro se selecciona entre mayor termoestabilidad, mayor estabilidad proteolítica o mayor actividad específica, más preferentemente la mayor estabilidad proteolítica o la mayor actividad específica.

20 En las realizaciones anteriores de la descripción, que se refieren a los métodos de preparar una variante de la enzima fitasa, la variante de la enzima fitasa se selecciona preferentemente por su mayor termoestabilidad y por su mayor estabilidad proteolítica y por su mayor actividad específica en al menos un ciclo de mutagénesis [etapas a) a c)], preferentemente más de un ciclo, a saber, ciclos de selección iterativos.

La enzima fitasa madre procede preferentemente de *Buttiauxella* P1-29.

25 En los métodos para preparar una variante de la enzima fitasa, comprendiendo dicho método someter a mutagénesis la secuencia de ADN que codifica una enzima fitasa madre, la secuencia de ADN que codifica una enzima fitasa madre se somete preferentemente a una mutagénesis aleatoria, más preferentemente a la PCR propensa a errores, incluso más preferentemente a la PCR en el umbral de error.

30 Los métodos preferentes de mutagénesis de secuencia del ADN que codifica una enzima fitasa madre es la PCR propensa a errores, más preferentemente la PCR en el umbral de error, pudiéndose también utilizar otros métodos de mutagénesis en lugar de la PCR propensa a errores o la PCR en el umbral de error, o junto con la PCR propensa a errores o la PCR en el umbral de error. Véase el ejemplo 12, que proporciona referencias para los métodos adecuados para la PCR propensa a errores y para la PCR en el umbral de error. Otro método adecuado para la PCR mutagénica lo describen Cadwell y Joyce [*PCR Methods Appl.* 3 (1994), 136-140].

35 La terminología «expresión en una célula hospedadora» cuando se utiliza en el contexto de las realizaciones que se refieren a un «método para preparar una variante de la enzima fitasa» se define preferentemente como la producción de la variante de la enzima fitasa en un organismo, órgano o célula vivos como los definidos en la presente memoria. Los hospedadores preferentes son *Escherichia coli* K12; *Bacillus subtilis*; *Saccharomyces cerevisiae*. Las enzimas fitásicas detalladas en la presente memoria se caracterizaron después de la expresión heteróloga en uno o más de los  
40 hospedadores de expresión siguientes: *Escherichia coli* K12; *Bacillus subtilis*; *Saccharomyces cerevisiae*.

45 Sin embargo, se considera que para el propósito de selección de las variantes de la enzima fitasa como las descritas en la presente memoria, tales métodos pueden emplear métodos de expresión in vitro de las variantes de la enzima fitasa, preferentemente para el uso en la etapa c) de dichos métodos, que utilizan la maquinaria de transcripción y traducción aislada de una o más células aisladas de uno o más organismos vivos o virus. Tal producción in vitro de las variantes de la fitasa de la invención también se puede utilizar para seleccionar las variantes preferentes de la fitasa. La expresión in vitro se puede realizar convenientemente mediante técnicas estándares. Para más información, por favor, consulte *In vitro Expression Guide* disponible de Promega Inc. (Part n.º BR053).

#### Definiciones de fenotipos variantes

50 Las variantes con la mayor termoestabilidad (diferencia de termoestabilidad) se determinan preferentemente con los métodos descritos en el ejemplo 12.

La variante de la enzima fitasa preparada mediante el método para preparar variantes de la enzima fitasa tiene preferentemente una diferencia de termoestabilidad (DT) de al menos 1,5, más preferentemente 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, más preferentemente al menos 20.

Las variantes con una mayor estabilidad proteolítica se determinan preferentemente mediante los métodos descritos en el ejemplo 12.

Preferentemente, la variante de la enzima fitasa de la invención tiene una estabilidad proteolítica (actividad residual) de al menos el 45%, preferentemente el 50%, 55%, más preferentemente al menos el 60% o el 65%, lo más preferentemente al menos el 70%.

Preferentemente, la variante de la fitasa de la invención tiene una actividad específica de más del 100% de actividad del tipo salvaje con un pH de 4,0, preferentemente de más del 105%, 110%, más preferentemente de más del 114%.

#### Realizaciones de variantes complementarias

En otra realización, la descripción da a conocer métodos para preparar piensos para consumo animal que comprenden una variante de la enzima fitasa, comprendiendo dicho método las etapas sucesivas de i) realizar uno o más de los métodos anteriores para preparar una variante de la enzima fitasa, y ii) añadir la variante de la enzima fitasa preparada a un alimento para consumo animal.

En una realización específica, la descripción da a conocer un método para preparar un pienso para consumo animal que comprende una variante de la enzima fitasa, comprendiendo dicho método

- 15 a) Seleccionar una enzima fitasa madre, en la que la enzima fitasa madre se selecciona entre
  - i. una enzima fitasa madre con una homología de al menos el 75% con la SEQ ID n.º 3 o un fragmento funcional de la misma,
  - ii. una enzima fitasa madre obtenida de *Buttiauxella spp.*, preferentemente *Buttiauxella P1-29*, y/o
  - iii. al menos una variante de la enzima fitasa
- 20 b) Realizar, al menos, una alteración que es una inserción, una delección o una sustitución de un resto de aminoácido en la enzima fitasa madre para obtener una variante de la enzima fitasa.
  - c) Detectar selectivamente una variante de la enzima fitasa que en comparación con la enzima fitasa madre tiene una mejora de las características, como las descritas en la presente memoria, preferentemente seleccionadas entre una o más de:
    - 25 i. mayor termoestabilidad y/o
    - ii. actividad específica y/o
    - iii. estabilidad proteolítica y/o
  - d) Preparar la variante de la enzima fitasa
  - e) Añadir la variante preparada de la enzima fitasa a un pienso para consumo animal.
- 30 En otra realización, la descripción da a conocer métodos para preparar un pienso para consumo animal que comprende una variante de la enzima fitasa.
  - a) Someter a mutagénesis la secuencia nucleotídica (preferentemente ADN) que codifica una enzima fitasa madre, en la que dicho nucleótido se selecciona entre un nucleótido que codifica
    - 35 i. una enzima fitasa madre con una homología de al menos el 75% con la SEQ ID n.º 3 o un fragmento funcional de la misma, y/o
    - ii. una enzima fitasa madre obtenida de *Buttiauxella spp.*, preferentemente de *Buttiauxella P1-29*.
  - b) Expresar la secuencia nucleotídica mutada (preferentemente ADN) obtenida en la etapa a) en una célula hospedadora y
  - c) Detectar selectivamente las células hospedadoras que expresan una variante de la enzima fitasa que en comparación
    - 40 con la enzima fitasa madre tiene una mejora de las características, como las descritas en la presente memoria, seleccionadas preferentemente entre una o más de:
      - i. mayor termoestabilidad y/o
      - ii. mayor actividad específica y/o

iii. mayor estabilidad proteolítica y/o

d) Preparar la variante de la enzima fitasa expresada por la célula hospedadora

f) Añadir la variante preparada de la enzima fitasa a un pienso para consumo animal.

Las realizaciones descritas y los aspectos preferentes del método de preparación de una variante de la enzima fitasa también se aplican a los métodos anteriores de preparación de un pienso para consumo animal que comprende una variante de la enzima fitasa.

En otro aspecto de la descripción, se da a conocer una célula hospedadora transformada o transfectada con un ácido nucleico que codifica una fitasa como las descritas en la presente memoria.

Convenientemente, la célula hospedadora de acuerdo con este aspecto de la descripción comprende una fitasa que comprende una secuencia de aminoácidos, o un fragmento funcional de la misma, como la presentada en la SEQ ID n.º 3 o una secuencia que es homóloga al menos al 75% con ésta.

En una realización preferente, dicha célula hospedadora produce una fitasa.

En otro aspecto de la descripción, se da a conocer una célula hospedadora transformada o transfectada con un ácido nucleico que codifica una fitasa de acuerdo con la descripción. Preferentemente, la fitasa es una fitasa de *Buttiauxella sp.* como se describe en la presente memoria o un homólogo o derivado de la misma. Convenientemente, dicha enzima fitasa comprende una secuencia de aminoácidos, o un fragmento funcional de la misma, como se presenta o bien en la SEQ ID n.º 3 o bien en una secuencia que es homóloga (idéntica) al menos al 75% a ésta. Preferentemente, dicha célula hospedadora produce una fitasa.

En una realización, la secuencia nucleotídica que se puede utilizar en la presente descripción se puede obtener de (aunque no tiene que obtenerse realmente de) *Buttiauxella sp.*, aunque se reconocerá que las enzimas aisladas y/o purificadas de cepas equivalentes se pueden utilizar igualmente.

Convenientemente, la célula hospedadora procede de un microorganismo que incluye las bacterias y los hongos, que incluyen la levadura. En una realización particularmente preferente, la célula hospedadora es una célula bacteriana procariota. Las células hospedadoras bacterianas adecuadas incluyen bacterias de diferentes grupos taxonómicos procariotas que incluyen las proteobacterias, que incluyen los miembros de la subdivisión alfa, beta, gamma, delta y epsilon, bacterias grampositivas tales como actinomicetos, firmicutes, clostridios y afines, flavobacterias, cianobacterias, bacterias verdes del azufre, bacterias verdes que no son del azufre y arqueas. Particularmente preferentes son las *Enterobacteriaceae* tales como *Escherichia coli*, las proteobacterias que pertenecen a la subdivisión gamma y las bacterias grampositivas de bajo contenido en GC tales como *Bacillus*.

Las células hospedadoras fúngicas adecuadas incluyen las levaduras seleccionadas del grupo que consiste en *Ascomycota*, que incluyen *Saccharomycetes* tales como *Pichia*, *Hansenula* y *Saccharomyces*, *Schizosaccharomycetes* tales como *Schizosaccharomyces pombe* y *Ascomycota* anamórficos que incluyen *Aspergillus*.

Otras células hospedadoras eucariotas adecuadas incluyen células de insectos tales como SF9, SF21, *Trychoplusiani* y células M121. Por ejemplo, los polipéptidos de acuerdo con la descripción se pueden expresar ventajosamente en sistemas de células de insectos. Así como se expresan en las células de insectos en cultivo, los genes de las fitasas se pueden expresar en organismos completos de insectos. Los vectores víricos tales como el baculovirus permiten la infección de insectos completos. Los insectos grandes, tales como las polillas de la seda, proporcionan un gran rendimiento de proteínas heterólogas. La proteína se puede extraer de los insectos de acuerdo con las técnicas de extracción convencionales. Los vectores de expresión adecuados para el uso en la descripción incluyen todos los vectores que son capaces de expresar proteínas foráneas en las estirpes celulares de insectos.

Otras células hospedadoras incluyen células vegetales seleccionadas entre el grupo que consiste en protoplastos, células, callos, tejidos, órganos, semillas, embriones, óvulos, cigotos, etc. La descripción también da a conocer plantas completas que se han transformado y que comprenden el ADN recombinante de la descripción.

La terminología «planta» incluye por lo general algas eucariotas, embriofitas que incluyen *Bryophyta*, *Pteridophyta* y *Spermatophyta* tales como gimnospermas y angiospermas.

Preferentemente, dicha célula hospedadora es un microorganismo. Los microorganismos preferentes incluyen células bacterianas procariotas preferentemente *E. coli*, *B. subtilis* y otras especies del género *Bacillus*, y levaduras, preferentemente *Hansenula polymorpha* y *Schizosaccharomyces pombe*.

En otro aspecto de la descripción, se da a conocer una cepa de célula bacteriana, *Buttiauxella sp.* P1-29 depositada por Danisco Global Innovation, Sokeritehtaantie 20, FIN-02460 Kantvik, Finlandia el 22 de septiembre de 2004 con el número de acceso NCIMB 41248. Tal célula se puede incorporar directamente en el pienso.

En otro aspecto, se da a conocer un método para producir fitasas que comprende transfectar una célula hospedadora con un vector de expresión o plásmido de acuerdo con la descripción, cultivar dicha célula hospedadora en condiciones para la expresión de la fitasa y extraer dicha fitasa del medio de cultivo de la célula hospedadora.

- 5 Convenientemente dicho método es para producir una fitasa, y comprende la expresión de una secuencia de aminoácidos como la presentada en la SEQ ID n.º 3 o una secuencia que tiene una homología de al menos el 75% con ésta o un fragmento eficaz de la misma en una célula hospedadora y la extracción de la proteína secretada a partir del medio de cultivo de la célula hospedadora.

- 10 Otro aspecto de la descripción da a conocer una composición de piensos que comprende una fitasa de acuerdo con la descripción. Preferentemente, la composición de piensos comprende una fitasa a una concentración de 10 a 10 000 U/kg de pienso, preferentemente de 200 a 2000 U/kg de pienso, más preferentemente de 500 a 1000 U/kg de pienso.

En una realización, la composición de piensos comprende una célula hospedadora de acuerdo con la invención.

En otro aspecto se da a conocer el uso de una fitasa de acuerdo con la invención en alimentos o piensos para consumo animal.

### ASPECTOS PREFERENTES

- 15 Los aspectos preferentes se presentan en las reivindicaciones acompañantes, y en la descripción y el apartado de ejemplos que siguen.

### VENTAJAS ADICIONALES

La presente invención resulta ventajosa porque proporciona fitasas que tienen una serie de propiedades que las hacen particularmente útiles como aditivos de los piensos para consumo animal.

- 20 En particular, las fitasas de la presente invención son activas a un pH bajo y, preferentemente, en el intervalo de pH 2 a 5,5, con una actividad máxima en torno a pH 4-4,5. Convenientemente, las fitasas de la presente invención son activas a los pH bajos (conservan aproximadamente el 40% de la actividad máxima a pH 2,5) del medio del estómago.

Además, las fitasas de la presente invención se secretan con eficacia tanto en el hospedador nativo como durante la expresión heteróloga, lo que conduce a la producción y aislamiento más eficaces para añadirlas a los piensos.

- 25 Además, las fitasas de la presente invención, preferentemente, tienen una amplia especificidad de sustrato que incluye sustratos penta-, tetra-, tri- y difosfato, lo que hace aumentar el fosfato total disponible para que lo absorba el animal (fosfato disponible). Las fitasas de la presente invención también, preferentemente, tienen una actividad específica elevada en la región de 300 U/mg ± aproximadamente el 10%, preferentemente al menos 300 U/mg.

- 30 Los productos de la presente invención se pueden utilizar como aditivos/complementos para alimentos y piensos. Los productos también pueden ser útiles para la producción comercial de diferentes inositol-fosfatos.

### FITATO/ÁCIDO FÍTICO/FITASAS

El ácido fítico (mioinositol-hexakisfosfato) es un constituyente importante de los cereales, legumbres y cultivos de semillas para aceite. La forma de la sal, el fitato, es la forma de almacenamiento principal del fósforo en estas plantas.

- 35 Las fitasas catalizan la hidrólisis de los monoésteres de fosfato del ácido fítico, lo que da lugar a la formación escalonada de mioinositol-pentakis-, -tetrakis-, -tris-, -bis- y -monofosfatos, así como la liberación de fosfato inorgánico.

La terminología «fitasa de tipo salvaje» o «tipo salvaje» como se utiliza en la presente memoria hace referencia a una enzima fitasa con una secuencia de aminoácidos encontrada en la naturaleza.

- 40 La terminología «variante de la fitasa» o «variante» o «forma modificada» se refiere a una enzima fitasa con una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de una fitasa madre que tiene una o más sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos, que en conjunto se denominan «mutaciones».

- 45 La terminología «fitasa madre» o «enzima madre» se refiere a una enzima fitasa de la que se obtiene una variante de la fitasa. Una fitasa madre puede ser una fitasa de tipo salvaje u otra variante de la fitasa. En particular, en la presente invención, una «fitasa madre» puede proceder de *Buttiauxella sp.* Convenientemente, la «fitasa madre» procede de la cepa P1-29 de *Buttiauxella* tal y como se describe en la presente memoria, que preferentemente tiene la secuencia de aminoácidos presentada en la SEQ ID n.º 3.

### AISLADA

En un aspecto, preferentemente, la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos está en una forma aislada. La

terminología «aislada» significa que la secuencia está al menos sustancialmente libre de al menos otro componente con el que la secuencia está asociado de forma natural en la naturaleza y como se encuentra en la naturaleza.

#### **PURIFICADA**

En un aspecto, preferentemente, la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos está en una forma purificada. La terminología «purificada» significa que la secuencia se encuentra en un estado relativamente puro al menos al 1%, puro al 5% o puro al 10%, más preferentemente puro al menos al 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%. En una realización preferente, cuando se hace referencia a un polipéptido, la pureza que se acaba de definir se determina en términos de estar purificado de otros polipéptidos mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS. En una realización preferente, cuando se refiere a un polinucleótido, la pureza tal y como se acaba de definir se determina en términos de estar purificado de otros polinucleótidos.

#### **SECUENCIA NUCLEOTÍDICA**

El alcance de la presente invención abarca secuencias nucleotídicas como las definidas en las reivindicaciones, que codifican enzimas que tienen las propiedades específicas que se definen en la presente memoria.

La terminología «secuencia de nucleótidos» o «secuencia nucleotídica» tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a una secuencia oligonucleotídica, secuencia nucleotídica o de ácido nucleico, y variante, homólogos, fragmentos y derivados de las mismas (tales como porciones de las mismas). La secuencia nucleotídica puede ser de origen genómico o sintético o recombinante, que puede ser mono- o bicatenaria si representa la cadena sentido o antisentido.

La terminología «secuencia nucleotídica», «secuencia de nucleotidos» o «molécula de ácido nucleico» en relación con la presente invención incluye ADN genómico, ADNc, ADN sintético y ARN. Preferentemente, significa ADN, más preferentemente secuencia de ADNc que codifica la presente invención.

En una realización preferente, la secuencia de nucleótidos cuando se refiere a la presente invención, y cuando queda abarcada por el alcance de por sí de la misma, no incluye la secuencia nucleotídica nativa de acuerdo con la presente invención cuando está en su entorno natural y cuando está unida a la secuencia o secuencias que se le asocian de forma natural que también están en su entorno natural. Para facilitar la consulta, llamaremos a esta realización preferente la «secuencia nucleotídica no nativa». En este sentido, la terminología «secuencia nucleotídica nativa» significa una secuencia de nucleótidos completa que se encuentra en su entorno nativo y cuando está operativamente unida a un promotor completo con el cual está asociada de forma natural, encontrándose dicho promotor también en su entorno nativo. No obstante, la secuencia de aminoácidos abarcada por el alcance de la presente invención se puede aislar y/o purificar después de la expresión de una secuencia nucleotídica en su organismo nativo. No obstante, preferentemente, la secuencia de aminoácidos abarcada por el alcance de la presente invención puede expresarse por una secuencia nucleotídica en su organismo nativo, pero en el cual la secuencia nucleotídica no se encuentra bajo el control del promotor con el cual está asociada de forma natural dentro del organismo.

#### **PREPARACIÓN DE UNA SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS**

Típicamente, la secuencia nucleotídica abarcada por el alcance de la presente invención o las secuencias nucleotídicas a utilizar en la presente invención se preparan mediante técnicas de ADN recombinante (a saber, ADN recombinante). Sin embargo, en una realización alternativa de la invención, la secuencia nucleotídica se podría sintetizar, por completo o en parte, mediante los métodos químicos bien conocidos en la técnica [véanse Caruthers M. H. et al., (1980) *Nuc. Acids Res. Symp. Ser.* 215-23 y Horn T. et al., (1980) *Nuc Acids Res. Symp. Ser.* 225-232].

Una secuencia nucleotídica que codifica tanto una enzima que tiene las propiedades específicas que se definen en la presente memoria como una enzima que es adecuada para la modificación, se puede identificar y/o aislar y/o purificar de cualquier célula u organismo que produzca dicha enzima. Se conocen bien en la técnica diferentes métodos para identificar y/o aislar y/o purificar las secuencias nucleotídicas. A modo de ejemplo, se pueden utilizar técnicas de amplificación por PCR para preparar más cantidad de una secuencia una vez que se ha identificado y/o aislado y/o purificado una secuencia adecuada.

A modo de ejemplo, se puede construir una genoteca de ADN genómico y/o una genoteca de ADNc utilizando ADN cromosómico o ARN mensajero del organismo que produce la enzima. Si se conoce la secuencia de aminoácidos de la enzima o una parte de la secuencia de aminoácidos de la enzima, se pueden sintetizar sondas oligonucleotídicas marcadas y utilizarlas para identificar los clones que codifican la enzima a partir de la genoteca genómica preparada del organismo. Alternativamente, se podría utilizar una sonda oligonucleotídica marcada que contenga secuencias homólogas a otro gen conocido de la enzima para identificar los clones que codifican la enzima. En el último caso, se utilizan condiciones de hibridación y de lavado del rigor más bajo.

Alternativamente, se podrían identificar los clones que codifican la enzima al introducir fragmentos de ADN genómico en un vector de expresión, tal como un plásmido, transformar las bacterias que no tienen la enzima con la genoteca de ADN genómico resultante y, a continuación, sembrar las bacterias transformadas sobre placas de agar que contienen un

sustrato para la enzima [por ejemplo, maltosa para detectar la producción de una enzima glucosidasa (maltasa)], lo que permite identificar los clones que expresan la enzima.

En otra alternativa más, la secuencia nucleotídica que codifica la enzima se puede preparar sintéticamente mediante los métodos estándares establecidos, por ejemplo, el método de fosforoamiditas descrito por Beucage S. L. et al., (1981) *Tetrahedron Letters*, 22, págs. 1859-1869, o el método descrito por Matthes et al., (1984) *EMBO J.* 3. págs. 801-805. En el método de las fosforoamiditas se sintetizan los oligonucleótidos, por ejemplo, en un sintetizador automático de ADN, se purifican, se aparean, se ligan y se clonan en los vectores apropiados.

La secuencia nucleotídica puede ser de origen mixto genómico y sintético, de origen mixto sintético y de ADNc, o de origen mixto genómico y de ADNc, se puede preparar ligando fragmentos de origen sintético, genómico o de ADNc (como resulte apropiado) de acuerdo con las técnicas estándares. Cada fragmento ligado corresponde a diferentes partes de la secuencia nucleotídica completa. La secuencia de ADN también se puede preparar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores específicos, por ejemplo, como se describió en la patente de los Estados Unidos US 4 683 202 o en Saiki R. K. et al., [*Science*, (1988) 239, págs. 487-491].

Debido a la degeneración del código genético, se pueden producir con facilidad secuencias nucleotídicas en las que el uso de los tripletes codónicos, para algunos o todos los aminoácidos codificados por la secuencia de nucleótidos original, se ha cambiado de manera que se produce una secuencia nucleotídica con una homología baja a la secuencia de nucleótidos original, pero que codifica la misma secuencia de aminoácidos, o una variante, que la codificada por la secuencia de nucleótidos original. Por ejemplo, para la mayoría de los aminoácidos, la degeneración del código genético se encuentra en la tercera posición del triplete codónico (posición de tambaleo) (para más información, véase Stryer, Lubert, *Biochemistry*, Tercera Edición, Freeman Press, ISBN 0-7167-1920-7), de manera que una secuencia de nucleótidos en la que todos los tripletes codónicos se han «tambaleado» en la tercera posición tendría una identidad del 66% aproximadamente con la secuencia de nucleótidos original; sin embargo, la secuencia nucleotídica reformada codificaría la misma secuencia primaria de aminoácidos, o una variante, que la secuencia de nucleótidos original.

Por lo tanto, la presente invención se refiere adicionalmente a cualquier secuencia de nucleótidos que tenga un uso de tripletes codónicos alternativo para al menos un triplete codónico que codifica un aminoácido, pero que codifica la misma secuencia polipeptídica, o una variante, que la secuencia polipeptídica codificada por la secuencia de nucleótidos original.

Además de esto, determinados organismos tienen un sesgo típico del uso de los tripletes codónicos que se utilizan para codificar los aminoácidos. Las tablas de uso preferente de codones están totalmente disponibles y se pueden utilizar para preparar genes con codones optimizados. Tales técnicas de optimización de codones se utilizan por norma para optimizar la expresión de transgenes en un huésped heterólogo.

## EVOLUCIÓN MOLECULAR

Una vez que se ha aislado y/o purificado la secuencia nucleotídica que codifica la enzima, o se ha identificado una secuencia nucleotídica que codifica una posible enzima, puede resultar deseable la modificación de la secuencia nucleotídica seleccionada, por ejemplo, puede resultar deseable mutar la secuencia para preparar una enzima de acuerdo con la presente invención.

Se pueden introducir mutaciones mediante oligonucleótidos sintéticos. Estos oligonucleótidos contienen secuencias nucleotídicas que flanquean los sitios de mutación deseados.

En Morinaga et al [*Biotechnology* (1984) 2, págs. 646-649] se describe un método adecuado. Otro método para introducir mutaciones en las secuencias nucleotídicas que codifican la enzima se describe en Nelson y Long [*Analytical Biochemistry* (1989) 180, págs. 147-151].

En lugar de la mutagénesis específica de sitio, tal y como se describió anteriormente, se pueden introducir mutaciones al azar, por ejemplo, mediante un kit comercial tal como el kit GeneMorph de Stratagene para mutagénesis por PCR, o el kit Diversify de Clontech para mutagénesis al azar por PCR.

Un tercer método para obtener secuencias nuevas es fragmentar secuencias nucleotídicas no idénticas, bien utilizando una serie de enzimas de restricción o bien una enzima tal como la ADNasa I, y reagrupar las secuencias nucleotídicas completas que codifican proteínas funcionales. Alternativamente, se pueden utilizar una o varias secuencias nucleotídicas no idénticas e introducir mutaciones durante el reensamblaje de la secuencia nucleotídica completa.

Por lo tanto, se pueden producir numerosas mutaciones aleatorias o específicas de sitio en una secuencia nucleotídica, bien in vivo o bien in vitro, y posteriormente detectar selectivamente la mejora de la funcionalidad del polipéptido codificado por diferentes medios.

Como ejemplo no limitante, se pueden recombinar mutaciones o variantes naturales de una secuencia polinucleotídica bien con el tipo salvaje o bien con otras mutaciones o variantes naturales para producir variantes nuevas. Tales

- variantes nuevas también se pueden detectar selectivamente por la mejora de la funcionalidad del polipéptido codificado. La producción de nuevas variantes preferentes se puede conseguir mediante diferentes métodos bien establecidos en la técnica, por ejemplo la mutagénesis en el umbral de error (WO 92/18645), la mutagénesis aleatoria mediada por oligonucleótidos (patente de los Estados Unidos US 5 723 323), el barajado de ADN (patente de los Estados Unidos US 5 605 793), el ensamblaje de genes exomediado (patente internacional WO 0058517). Se describen otros métodos adecuados, por ejemplo, en las patentes internacionales WO 0134835, WO 02/097130, WO 03/012100, WO 03/057247, WO 2004/018674 y las patentes de los Estados Unidos US 6 303 344 y US 6 132 970.

- La aplicación de los métodos mencionados anteriormente y simuladores de la evolución molecular permite identificar y seleccionar variantes de las enzimas de la presente invención que tienen características preferentes sin ningún conocimiento previo de la estructura ni de la función de las proteínas, y permite producir mutaciones impredecibles, pero beneficiosas, o variantes. Hay numerosos ejemplos de la aplicación de la evolución molecular en la técnica para optimizar o alterar la actividad enzimática, incluyendo tales ejemplos, pero sin limitarse a ellos, uno o más de lo siguiente: expresión y/o actividad optimizadas en una célula hospedadora o in vitro, aumento de la actividad enzimática, alteración de la especificidad del sustrato y/o producto, aumento o disminución de la estabilidad estructural o enzimática, alteración de la actividad/especificidad enzimática en las condiciones medioambientales preferentes, por ejemplo, temperatura, pH, sustrato.

Los métodos de evolución molecular anteriores se pueden utilizar en los métodos de preparación de una variante de la enzima fitasa como la descrita en la presente memoria.

### SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS

- 20 El alcance de la presente invención también abarca secuencias de aminoácidos de enzimas que tienen las propiedades específicas que se definen en la presente memoria.

- Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «secuencia de aminoácidos» o «secuencia aminoacídica» es sinónimo de la terminología «polipéptido» y/o la terminología «proteína». En algunos casos, la terminología «secuencia de aminoácidos» o «secuencia aminoacídica» es sinónima de la terminología «péptido». En algunos casos, la terminología «secuencia de aminoácidos» o «secuencia aminoacídica» es sinónima de la terminología «enzima».

- La secuencia de aminoácidos se puede preparar/aislar de una fuente adecuada, o se puede fabricar sintéticamente, o se puede preparar utilizando las técnicas de ADN recombinante. La enzima abarcada en la presente invención se puede utilizar junto con otras enzimas. Por lo tanto, la presente invención también cubre una combinación de enzimas en la que la combinación comprende la enzima de la presente invención y otra enzima, que puede ser otra enzima de acuerdo con la presente invención. Este aspecto se explica en un apartado posterior.

Preferentemente, la secuencia de aminoácidos cuando se refiere a la presente invención, y cuando queda abarcada de por sí por el alcance de la misma, no es una enzima nativa. En este sentido, la terminología «enzima nativa» significa la enzima entera que se encuentra en su entorno nativo y cuando se ha expresado desde su secuencia nucleotídica nativa.

### 35 VARIANTES/HOMÓLOGOS/DERIVADOS

La presente invención también abarca el uso de variantes, homólogos y derivados de cualquier secuencia de aminoácidos de una enzima o de cualquier secuencia nucleotídica que codifica tal enzima.

- En la presente memoria, la terminología «homólogo» significa una entidad que tiene cierta homología con las secuencias de aminoácidos y las secuencias de nucleótidos. En la presente memoria, la terminología «homología» se puede hacer equivalente a «identidad». Convenientemente, «homólogo» en ese contexto se refiere al porcentaje de identidad de secuencia entre dos enzimas después de alinear sus secuencias mediante algoritmos de alineación como se describe con más detalle más adelante.

- En el presente contexto, una secuencia de aminoácidos homóloga se pretende que incluya una secuencia de aminoácidos que puede ser idéntica a la secuencia al menos al 75, 80, 81, 85 o 90%, preferentemente idéntica al menos al 95, 96, 97, 98 o 99%. Típicamente, los homólogos comprenderán los mismos sitios activos, etc., por ejemplo, como la secuencia de aminoácidos en cuestión. Aunque la homología también se puede considerar en términos de similitud (a saber, los restos de aminoácidos que tienen unas propiedades químicas o funciones similares), en el contexto de la presente descripción se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

- Por «fragmento funcional» se quiere hacer referencia a un fragmento del polipéptido que conserva las propiedades características de ese polipéptido. En el contexto de la presente descripción, un fragmento funcional de una enzima fitasa es un fragmento que conserva la capacidad de escisión de carotenoides de la proteína completa.

En el presente contexto, una secuencia nucleotídica homóloga se pretende que incluya una secuencia nucleotídica que puede ser idéntica al menos al 75, 80, 81, 85 o 90%, preferentemente idéntica al menos al 95, 96, 97, 98 o 99%, a una

secuencia nucleotídica que codifica una enzima de la presente descripción (la secuencia en cuestión). Típicamente, los homólogos comprenderán las mismas secuencias que codifican los sitios activos, etc., como la secuencia en cuestión. Aunque también se pueden considerar la homología en términos de similitud (a saber, restos de aminoácidos que tienen propiedades químicas o funciones similares), en el contexto de la presente descripción se prefiere expresar la

5 homología en términos de identidad de secuencia.

Para las secuencias de aminoácidos y las secuencias de nucleótidos, se pueden realizar comparaciones de homología a ojo o, con más frecuencia, con la ayuda de programas de comparación de secuencias de fácil acceso. Estos programas informáticos disponibles en el mercado calculan el porcentaje de homología entre dos o más secuencias.

El porcentaje de homología se puede calcular sobre secuencias contiguas, a saber, se alinea una secuencia con la otra

10 secuencia y cada aminoácido en una secuencia se compara directamente con el correspondiente aminoácido de la otra secuencia, de uno en uno. Se denomina alineamiento «sin huecos». Típicamente, tales alineamientos sin huecos se realizan sólo sobre un número relativo pequeño de restos.

Aunque es un método muy simple y coherente, no consigue tener en cuenta que, por ejemplo, en un par de secuencias por lo demás idénticas, una inserción o delección ocasionará que los restos de aminoácidos siguientes no queden

15 alineados, lo que posiblemente dé lugar a una gran reducción del porcentaje de homología cuando se realiza el alineamiento global. En consecuencia, la mayoría de los métodos de comparación de secuencias se diseñan para que generen alineamientos óptimos que tienen en cuenta las posibles inserciones y delecciones sin penalizar indebidamente la puntuación de homología global. Esto se consigue introduciendo «huecos» en el alineamiento de secuencias para intentar aumentar al máximo la homología local.

No obstante, estos métodos más complejos asignan «penalizaciones por hueco» a cada hueco que se genera en el

20 alineamiento, por lo que, para el mismo número de aminoácidos idénticos, un alineamiento de secuencias con el menor número de huecos que sea posible (lo que refleja la mayor relación entre las dos secuencias que se comparan) conseguirá una mayor puntuación que uno con muchos huecos. Típicamente se utiliza un «coste afín de huecos» que añaden un coste relativamente elevado a la existencia de un hueco y una penalización menor para cada resto adicional

25 en el hueco. Se trata del sistema de puntuación de huecos utilizado con más frecuencia. Las penalizaciones elevadas de huecos producirán, por supuesto, alineamientos optimizados con menos huecos. La mayoría de los programas de alineamiento permiten modificar las penalizaciones de los huecos. Sin embargo, se prefiere utilizar los valores por defecto cuando se utiliza tal programa informático para las comparaciones de secuencias. Por ejemplo, cuando se utiliza el programa Bestfit del paquete GCG de la Universidad de Wisconsin, la penalización del hueco por defecto para las

30 secuencias de aminoácidos es de -12 para un hueco y de -4 para cada extensión.

Por lo tanto, el cálculo del porcentaje máximo de homología requiere primero producir un alineamiento óptimo que tenga en cuenta las penalizaciones de los huecos. Un programa informático adecuado para realizar tal alineamiento es Bestfit del paquete GCG de la Universidad de Wisconsin (Devereux et al., 1984, *Nuc. Acids Research* 12, pág. 387). Los

35 ejemplos de otros programas informáticos que puedan realizar comparaciones de secuencias incluyen, pero sin limitarse a ellos, el paquete BLAST (véase Ausubel et al., 1999, *Short Protocols in Molecular Biology*, 4.<sup>a</sup> edición, capítulo 18), FASTA (Altschul et al., 1990, *J. Mol. Biol.* 403-410) y la suite GENWORKS de herramientas de comparación. BLAST y FASTA están disponibles para búsquedas remotas (en línea) y locales (sin línea) (véase Ausubel et al., 1999, *Short Protocols in Molecular Biology*, págs. 7-58 a 7-60).

Sin embargo, para algunas aplicaciones, se prefiere utilizar el programa Bestfit de GCG. Una nueva herramienta,

40 llamada BLAST 2 Sequences, está disponible también para comparar secuencias de proteínas y nucleotídicas (véanse *FEMS Microbiol. Lett.* 1999, 174 (2): 247-50; *FEMS Microbiol. Lett.* 1999, 177 (1): 187-8 y [tatiana@ncbi.nlm.nih.gov](mailto:tatiana@ncbi.nlm.nih.gov)).

Aunque el porcentaje de homología final se puede medir en términos de identidad, el proceso de alineamiento en sí mismo no se suele basar en una comparación de parejas de todo o nada. En lugar de eso, generalmente se utiliza una

45 matriz de puntuaciones escalonadas de la similitud que asigna puntuaciones a cada pareja comparada basándose en la similitud química o la distancia evolutiva. Un ejemplo de tal matriz que se utiliza con frecuencia es la matriz BLOSUM62, la matriz por defecto de la suite de programas BLAST. Los programas del GCG de la Universidad de Wisconsin generalmente utilizan o bien los valores por defecto públicos o bien una tabla de comparaciones de símbolos personalizada, si se le suministra (véase el manual del usuario para más detalles). Para algunas aplicaciones, se prefiere utilizar los valores por defecto públicos para el paquete GCG, o en el caso de otros programas informáticos, la

50 matriz por defecto, tal como BLOSUM62.

Alternativamente, se pueden calcular los porcentajes de homología utilizando la peculiaridad de alineamiento múltiple en DNASIS™ (Hitachi Software), basada en un algoritmo análogo a CLUSTAL (Higgins D. G. y Sharp P. M. (1988), *Gene* 73 (1), 237-244).

Una vez que el programa informático ha producido un alineamiento óptimo, es posible calcular el porcentaje de

55 homología, preferentemente un porcentaje de identidad de secuencia. El programa informático lo suele realizar como parte de la comparación de secuencias y genera un resultado numérico.

En un aspecto preferente de la presente descripción, se utilizan los programas informáticos y ajustes que siguen para calcular el porcentaje de homología/identidad entre las secuencias. Para las secuencias de aminoácidos, se calcula el porcentaje de identidad (homología) o «positivos» mediante AlignX VectorNTI (Vector NTI Advance 9.1 de Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, EE.UU.) para cada posible par de secuencias de aminoácidos. Los ajustes son los parámetros por defecto (penalización por apertura de hueco: 10; penalización de la extensión del hueco: 0,1).

- 5 Para las secuencias de ácido nucleico, el porcentaje de identidad (homología) o «positivos» se calcula mediante el programa AlignX VectorNTI de Informax Inc. (EE.UU.) para cada posible par de secuencias de ácido nucleico. Los ajustes son los ajustes por defecto para ADN: penalización de la apertura de hueco: 15, y penalización de la extensión del hueco: 6,66 (los mismos ajustes para los alineamientos múltiples).
- 10 Preferentemente, la identidad (homología) de aminoácidos se calcula a lo largo de la secuencia de aminoácidos completa o para el ácido nucleico de un polinucleótido correspondiente que codifica la secuencia de aminoácidos completa correspondiente.

Las secuencias también pueden tener deleciones, inserciones o sustituciones de restos de aminoácidos que producen un cambio silencioso y dan lugar a un sustancia funcionalmente equivalente. Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos deliberadas basándose en la similitud de las propiedades de los aminoácidos (tales como polaridad, carga, solubilidad, hidrofobia, hidrofilia y/o la naturaleza anfipática de los restos) y, por lo tanto, resulta útil reunir los aminoácidos en grupos funcionales. Los aminoácidos se pueden agrupar basándose solo en las propiedades de su cadena lateral. Sin embargo, es más útil incluir los datos de mutación también. Por lo tanto, los conjuntos de aminoácidos que se obtienen es probable que se conserven por razones estructurales. Estos conjuntos se pueden describir en forma de un diagrama de Venn [Livingstone C. D. y Barton G. J. (1993) «Protein sequence alignments: a strategy for the hierarchical analysis of residue conservation» *Comput. Appl. Biosci.* 9: 745-756; Taylor W. R. (1986) «The classification of amino acid conservation» *J. Theor. Biol.* 199; 205-218]. Se pueden realizar sustituciones conservativas, por ejemplo, según la tabla que sigue que describe un agrupamiento de aminoácidos en diagrama de Venn aceptado de forma general.

CONJUNTO		SUBCONJUNTO	
Hidrófobo	F W Y H K M I L V A G C	Aromático	F W Y H
		Alifático	I L V
Polar	W Y H K R E D C S T N Q	Cargado	H K R E D
		Cargado positivamente	H K R
		Cargado negativamente	E D
Pequeño	V C A G S P T N D	Diminuto	A G S

25 La presente descripción también abarca la sustitución homóloga («sustitución» y «reemplazo» se utilizan ambos en la presente memoria para significar el intercambio de un resto de aminoácido existente por un resto alternativo) que se pueda producir, a saber, sustitución entre similares, tal como básico por básico, ácido por ácido, polar por polar, etc. También se puede producir la sustitución no homóloga, a saber, de una clase de resto por otra o alternativamente que implique la inclusión de aminoácidos no naturales tales como ornitina (de aquí en adelante citado como Z), diaminobutirato de ornitina (de aquí en adelante citado como B), norleucina ornitina (de aquí en adelante citado como O), pirlalanina, tienilalanina, naftilalanina y fenilglicina.

También se pueden realizar reemplazos con aminoácidos no naturales.

35 Las secuencias de aminoácidos de las variantes pueden incluir grupos espaciadores adecuados que se pueden introducir entre dos restos aminoacídicos cualesquiera de la secuencia, que incluyen grupos alquilo tales como grupos metilo, etilo o propilo, además de espaciadores aminoacídicos tales como restos glicina o β-alanina. Otra forma más de variación, que implica la presencia de uno o más restos aminoacídicos en forma peptoide, será bien conocida para los expertos en la técnica. Para despejar las dudas, se utiliza «la forma peptoide» para referirse a restos aminoacídicos variantes en los que el grupo sustituyente del carbono α se encuentra en el átomo de nitrógeno del resto en vez de en el carbono α. En la técnica se conocen los procedimientos para preparar péptidos en la forma peptoide, por ejemplo, Simon R. J. et al., *PNAS* (1992) 89 (20), 9367-9371 y Horwell D. C., *Trends Biotechnol.* (1995) 13 (4), 132-134.

Las secuencias nucleotídicas a utilizar en la presente invención pueden incluir dentro de ellas nucleótidos sintéticos o modificados. En la técnica se conocen muchos tipos diferentes de modificación de oligonucleótidos. Estas incluyen esqueletos de metilfosfonato y fosforotioato y/o la adición de cadenas de acridina o polilisina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. Para los propósitos de la presente invención, hay que sobreentender que las secuencias nucleotídicas descritas en la presente memoria se pueden modificar por cualquier método disponible en la técnica. Tales modificaciones se pueden realizar para mejorar la actividad in vivo o la duración esperada de las secuencias nucleotídicas de la presente invención.

La presente invención también abarca el uso de secuencias nucleotídicas que son complementarias a las secuencias presentadas en la presente memoria, o a cualquier derivado, fragmento o derivado de las mismas. Si la secuencia es complementaria a un fragmento de la misma, entonces se puede utilizar esa secuencia como una sonda para identificar secuencias codificantes similares en otros organismos, etc.

Los polinucleótidos que no son homólogos al 100% a las secuencias de la presente invención, pero que caen dentro del alcance de la invención, se pueden obtener de diferentes maneras. Otras variantes de las secuencias descritas en la presente memoria se pueden obtener, por ejemplo, al rastrear con sondas las genotecas de ADN construidas a partir de un abanico de individuos, por ejemplo individuos de poblaciones diferentes. Además, se pueden obtener otros homólogos, y tales homólogos y sus fragmentos serán capaces, por lo general, de hibridarse selectivamente a las secuencias mostradas en la lista de secuencias de la presente memoria. Tales secuencias se pueden obtener al rastrear con sondas las genotecas de ADNc o las genotecas de ADN genómico construidas a partir de otras especies, comprendiendo las sondas utilizadas para el rastreo de tales genotecas toda o parte de una cualquiera de las secuencias de la lista de secuencias adjunta en las condiciones de rigor de medio a elevado. Se aplican consideraciones similares para obtener homólogos de especies y variantes alélicas del polipéptido o de las secuencias de nucleótidos de la invención.

También se pueden obtener variantes y homólogos de cepas o especies utilizando la PCR degenerada que utilizará cebadores diseñados para hibridarse selectivamente sobre secuencias de las variantes y los homólogos que codifican las secuencias aminoacídicas conservadas de las secuencias de la presente invención. Se pueden predecir las secuencias conservadas, por ejemplo, mediante el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de varias variantes u homólogos. Se pueden realizar los alineamientos de las secuencias mediante los programas informáticos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se utiliza mucho el programa PileUp del paquete GCG de la Universidad de Wisconsin.

Los cebadores utilizados en la PCR degenerada contendrán una o más posiciones degeneradas y se utilizarán en condiciones de rigor más bajo que el empleado para clonar secuencias con cebadores de secuencias únicas de secuencias conocidas.

Alternativamente, se pueden obtener tales polinucleótidos mediante mutagénesis dirigida de las secuencias caracterizadas. Esto puede ser útil si, por ejemplo, se necesitan cambios silenciosos de codones en las secuencias para optimizar el uso preferente de codones al de una célula hospedadora particular en la que se van a expresar las secuencias polinucleotídicas. Se pueden desear otros cambios de secuencia para introducir sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, o para alterar la propiedad o la función de los polipéptidos codificados por los polinucleótidos.

Los polinucleótidos (secuencias nucleotídicas) de la invención se pueden utilizar para generar un cebador, por ejemplo un cebador de PCR, un cebador para una reacción de amplificación alternativa, una sonda, por ejemplo marcada con una marcación que se revela mediante los medios convencionales utilizando marcaciones radioactivas o no radioactivas, o se pueden clonar los polinucleótidos en vectores. Tales cebadores, sondas y otros fragmentos tendrán al menos 15, preferentemente al menos 20, por ejemplo al menos 25, 30 o 40, nucleótidos de longitud, y también quedan abarcados por la terminología «polinucleótidos» de la invención tal y como se emplea en la presente memoria.

Se pueden producir polinucleótidos tales como polinucleótidos de ADN y sondas de acuerdo con la invención por recombinación, mediante síntesis o por cualquier medio disponible para los expertos en la técnica. También se pueden clonar mediante las técnicas estándares.

En general, los cebadores se producirán por medios sintéticos, que implican una fabricación por etapas de la secuencia de ácido nucleico deseada, en la que se añade un nucleótido cada vez. Las técnicas para llevar a cabo esto mediante técnicas automáticas están fácilmente disponibles en la técnica.

Los polinucleótidos más largos se producirán por lo general utilizando medios recombinantes, por ejemplo mediante técnicas de clonación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Los cebadores se pueden diseñar para que contengan sitios de reconocimiento adecuados para las enzimas de restricción, de modo que el ADN amplificado se pueda clonar en un vector de clonación adecuado.

## **BIOLÓGICAMENTE ACTIVA**

Preferentemente, las secuencias de las variantes, etc., son, al menos, tan biológicamente activas como las secuencias

presentadas en la presente memoria.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, «biológicamente activa» se refiere a una secuencia que tiene una función estructural similar (pero no necesariamente en el mismo grado) y/o una función reguladora similar (pero no necesariamente en el mismo grado), y/o una función bioquímica similar (pero no necesariamente en el mismo grado) a las de la secuencia que se produce en la naturaleza.

En particular, las secuencias de las variantes o las formas modificadas de las mismas tienen un perfil enzimático similar al perfil de la fitasa identificada en la presente memoria. Este perfil incluye características tales como ser una proteína secretada, tener un pH óptimo en el intervalo de pH de 2 a 5,5, preferentemente de 4,0 a 4,5, conservar al menos el 50% de la actividad máxima a lo largo del intervalo de pH de 2,0 a 5,5 y/o tener una actividad específica de más de 300 U/mg.

## HIBRIDACIÓN

La presente invención también abarca las secuencias que son complementarias a las secuencias de los ácidos nucleicos de la presente invención o las secuencias que son capaces de hibridarse tanto a las secuencias de la presente invención como a las secuencias que son complementarias a éstas.

La terminología «hibridación» tal y como se utiliza en la presente memoria incluiría «el procedimiento mediante el cual una hebra de ácido nucleico se junta con una hebra complementaria mediante el apareamiento de las bases», así como el procedimiento de amplificación como el llevado a cabo en las tecnologías de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La presente invención también abarca la utilización de secuencias de nucleótidos que son capaces de hibridarse a las secuencias que son complementarias a las secuencias presentadas en la presente memoria, o cualquier derivado, fragmento o derivado de las mismas.

La terminología «variante» también abarca las secuencias que son complementarias a las secuencias que son capaces de hibridarse a las secuencias de nucleótidos presentadas en la presente memoria.

Preferentemente, la terminología «variante» abarca las secuencias que son complementarias a las secuencias que son capaces de hibridarse en condiciones rigurosas (por ejemplo, 50 °C y SSC a 0,2X {SSC a 1X = NaCl a 0,15 mM, citrato trisódico a 0,015 mM, pH 7,0}) con las secuencias de nucleótidos presentadas en la presente memoria.

Más preferentemente, la terminología «variante» abarca las secuencias que son complementarias a las secuencias que son capaces de hibridarse en condiciones muy rigurosas (por ejemplo, 65 °C y SSC a 0,1X {SSC a 1X = NaCl a 0,15 M, citrato trisódico a 0,015 M, pH 7,0}) con las secuencias de nucleótidos presentadas en la presente memoria.

La presente invención también se refiere a las secuencias de nucleótidos que se hibridan con las secuencias de nucleótidos de la presente invención (que incluyen las secuencias complementarias de las presentadas en la presente memoria).

La presente invención también se refiere a las secuencias de nucleótidos que son complementarias a las secuencias que se hibrida con las secuencias de nucleótidos de la presente invención (que incluyen las secuencias complementarias de las presentadas en la presente memoria).

También se incluyen en el alcance de la presente invención las secuencias polinucleotídicas que son capaces de hibridarse con las secuencias de nucleótidos presentadas en la presente memoria en condiciones de rigor intermedio a máximo.

En un aspecto preferente, la presente invención cubre las secuencias de nucleótidos que se hibridan con la secuencia de nucleótidos de la presente invención, o con el complemento de la misma, en condiciones rigurosas (por ejemplo 50 °C y SSC a 2X).

En un aspecto más preferente, la presente invención cubre las secuencias de nucleótidos que se hibridan con la secuencia de nucleótidos de la presente invención, o con el complemento de la misma, en condiciones muy rigurosas (por ejemplo 65 °C y SSC a 1X).

## 45 MUTAGÉNESIS ESPECÍFICA DE SITIO

Una vez que se ha aislado y/o purificado la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima, o se ha identificado una secuencia de nucleótidos que codifica una posible enzima, puede ser deseable mutar la secuencia para preparar una enzima de la presente invención.

Las mutaciones se pueden introducir mediante oligonucleótidos sintéticos. Estos oligonucleótidos contienen secuencias

de nucleótidos que flanquean los sitios de mutación deseados.

Un método adecuado se describe en Morinaga et al., [*Biotechnology* (1984) 2, págs. 646-649]. Otro método para introducir mutaciones en las secuencias de nucleótidos que codifican la enzima se describe en Nelson y Long [*Analytical Biochemistry* (1989), 180, págs. 147-151]. Se describe otro método en Sarkar y Sommer [*Biotechniques* (1990), 8, págs. 404-407 «The megaprimer method of site directed mutagenesis»].

### RECOMBINANTE

En un aspecto, la secuencia a utilizar en la presente invención es una secuencia recombinante, a saber, una secuencia que se ha preparado mediante las técnicas de ADN recombinante.

Estas técnicas de ADN recombinante se encuentran entre las capacidades del experto en la técnica. Tales técnicas se explican en la bibliografía, por ejemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda edición, Libros 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

### SINTÉTICA

En un aspecto, la secuencia a utilizar en la presente invención es una secuencia sintética, a saber, una secuencia que se ha preparado in vitro mediante síntesis enzimática o química. Incluye, pero sin limitarse a ellas, secuencias construidas con el uso de codones óptimo para los organismos hospedadores, tales como las levaduras metilótrofas *Pichia* y *Hansenula*.

### EXPRESIÓN DE LAS ENZIMAS

La secuencia de nucleótidos a utilizar en la presente invención se puede incorporar en un vector replicable recombinante. Se puede utilizar el vector para replicar y expresar la secuencia nucleotídica, en forma de enzima, en una célula hospedadora compatible y/o a partir de ella.

Se puede controlar la expresión mediante secuencias de control, por ejemplo, secuencias reguladoras.

La enzima producida por una célula recombinante hospedadora mediante la expresión de la secuencia de nucleótidos se puede secretar o se puede mantener dentro de la célula según la secuencia y/o el vector utilizado. Las secuencias codificantes se pueden diseñar con secuencias señal que mejoran la secreción directa de las secuencias codificantes en sí a través de una membrana celular de determinados procariontes o eucariotas.

Ventajosamente, las enzimas de la presente invención son secretadas.

### VECTOR DE EXPRESIÓN

La terminología «plásmido», «sistema de vector» o «vector de expresión» significa una construcción capaz de realizar una expresión in vivo o in vitro. En el contexto de la presente invención, estas construcciones se pueden utilizar para introducir genes que codifican enzimas en las células hospedadoras. Convenientemente, los genes cuya expresión se introduce se pueden denominar «transgenes expresables». Preferentemente, el vector de expresión está incorporado en el genoma de un organismo hospedador adecuado. La terminología «incorporado» cubre preferentemente la incorporación estable en el genoma.

Las secuencias de nucleótidos descritas en la presente memoria, que incluyen la secuencia de nucleótidos de la presente invención, pueden estar presentes en un vector en el que la secuencia de nucleótidos está operativamente unida a secuencias reguladoras capaces de mantener la expresión de la secuencia de nucleótidos en un organismo hospedador adecuado.

Los vectores a utilizar en la presente invención se pueden introducir por transformación en una célula hospedadora adecuada como se describe más adelante para proporcionar la expresión de un polipéptido de la presente invención.

La elección del vector, por ejemplo un plásmido, cósmido o vector fágico, dependerá a menudo de la célula hospedadora en la que se introduce.

Los vectores a utilizar en la presente invención pueden contener uno o más genes marcadores de selección, tales como un gen que confiere resistencia a antibióticos, por ejemplo, resistencia a ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Alternativamente, se puede llevar a cabo la selección mediante cotransformación (como se describió en la patente internacional WO 91/17243).

Se pueden utilizar los vectores in vitro, por ejemplo para la producción de ARN, o se pueden utilizar para transfectar, transformar, transducir o infectar una célula hospedadora.

Por lo tanto, en una realización más, la invención da a conocer un método para construir secuencias de nucleótidos de

la presente invención mediante la introducción de una secuencia de nucleótidos de la presente invención en un vector replicable, mediante la introducción del vector en una célula hospedadora compatible, y haciendo crecer la célula hospedadora en condiciones que conllevan la replicación del vector.

- 5 El vector puede comprender adicionalmente una secuencia de nucleótidos que permite que el vector se replique en una célula hospedadora en cuestión. Ejemplos de tales secuencias son los orígenes de replicación de los plásmidos pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1, pIJ101, pTZ12 y pET11.

### SECUENCIAS REGULADORAS

- 10 En algunas aplicaciones, la secuencia de nucleótidos a utilizar en la presente invención está operativamente unida a una secuencia reguladora que es capaz de mantener la expresión de la secuencia de nucleótidos, tal como mediante la elección de la célula hospedadora. A modo de ejemplo, la presente invención cubre un vector que comprende la secuencia de nucleótidos de la presente invención operativamente unida a tal secuencia reguladora, a saber, el vector es un vector de expresión.

- 15 La terminología «operativamente unido» se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos se encuentran en una relación que les permite funcionar en la manera para la que se diseñaron. Una secuencia reguladora «operativamente unida» a una secuencia codificante está ligada de tal modo que la expresión de la secuencia codificante se consigue en una condición compatible con las secuencias de control.

La terminología «secuencias reguladoras» incluye promotores y potenciadores y otras señales de regulación de la expresión.

- 20 La terminología «promotor» se utiliza en el sentido normal de la técnica, por ejemplo, un sitio de fijación de la ARN polimerasa.

La potenciación de la expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima de la presente invención también se puede conseguir mediante la selección de regiones reguladoras heterólogas, por ejemplo promotores, del péptido líder para la secreción, y de regiones terminadoras.

- 25 Preferentemente, la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la presente invención está operativamente unida al menos a un promotor.

Se conocen bien en la técnica ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de la secuencia de nucleótidos en un hospedador bacteriano, fúngico o de levadura.

### CONSTRUCCIONES

- 30 La terminología «construcción», que es sinónimo de términos tales como «conjugado», «casete» e «híbrido», incluye una secuencia de nucleótidos a utilizar de acuerdo con la presente invención directa o indirectamente unida a un promotor.

- 35 Un ejemplo de una unión indirecta es la dotación de un grupo espaciador adecuado, tal como una secuencia intrónica, tal como el intrón de Sh1 o el intrón de ADH, intercalado entre el promotor y la secuencia de nucleótidos de la presente invención. Lo mismo es cierto para la terminología «fusionada» en relación con la presente invención, que incluye la unión directa o indirecta. En algunos casos, la terminología no cubre la combinación natural de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína normalmente asociada al promotor del gen de tipo salvaje ni cuando ambos se encuentran en su medio natural.

La construcción puede incluso contener o expresar un marcador, lo que permite la selección de la construcción genética.

- 40 Para algunas aplicaciones, la construcción de la presente invención comprende preferentemente al menos la secuencia de nucleótidos de la presente invención operativamente unida a un promotor.

### CÉLULAS HOSPEDADORAS

- 45 La terminología «célula hospedadora» en relación con la presente invención incluye cualquier célula que comprende o bien la secuencia de nucleótidos o bien un vector de expresión como se ha descrito más arriba y que se utiliza para la producción recombinante de una enzima que tiene las propiedades específicas como las descritas en la presente memoria o en los métodos de la presente invención.

Por lo tanto, una realización adicional de la presente invención da a conocer células hospedadoras transformadas o transfectadas con una secuencia de nucleótidos que expresa las enzimas descritas en la presente invención. Las

células se elegirán para que sean compatibles con dicho vector y pueden, por ejemplo, ser células procariotas (por ejemplo, bacterianas), fúngicas, de levadura o vegetales. Preferentemente, las células hospedadoras no son células humanas.

5 Ejemplos de organismos hospedadores bacterianos adecuados son las especies bacterianas grampositivas o gramnegativas.

En una realización preferente, la célula hospedadora es *Escherichia coli* ya que se ha observado que la fitasa de *Buttiauxella* P1-29 se secreta con eficacia en *E. coli*. Las enzimas fitásicas, incluidas las variantes, se caracterizaron después de la expresión heteróloga en uno o más de los hospedadores de expresión siguientes: *Escherichia coli* K12; *Bacillus subtilis*; *Saccharomyces cerevisiae*. Por lo tanto, también se prefieren estos hospedadores.

10 Según la naturaleza de la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima de la presente invención, y/o si se desean procesamientos ulteriores de la proteína expresada, se podrían preferir hospedadores eucariotas tales como levaduras u otros hongos. En general, se prefieren las células de levadura sobre otras células fúngicas porque son más fáciles de manipular. No obstante, algunas proteínas se secretan mal desde la célula de levadura, o en algunos casos no se procesan adecuadamente (por ejemplo, hiperglicosilación en la levadura). En estos casos se debe seleccionar un  
15 organismo hospedador fúngico diferente.

La utilización de células hospedadoras adecuadas, tales como las células hospedadoras de levadura, fúngicas y vegetales, produciría las modificaciones postraduccionales (por ejemplo miristoilación, glucosilación, truncamiento, lapidación y fosforilación de tirosina, serina o treonina) que serían necesarias para conferir la actividad biológica óptima a los productos de expresión recombinantes de la presente invención.

20 La célula hospedadora puede ser una cepa con deficiencia de proteasas o sin proteasas.

El genotipo de la célula hospedadora se puede modificar para mejorar la expresión.

Ejemplos de modificaciones de células hospedadoras incluyen deficiencia de proteasas, complementación con ARNt raros y modificación del potencial reductor del citoplasma para favorecer la formación de puentes disulfuro.

25 Por ejemplo, la célula hospedadora de *E.coli* puede sobreexpresar ARNt raros para mejorar la expresión de proteínas heterólogas como se ejemplificó/describió en Kane [*Curr. Opin. Biotechnol.* (1995), 6, 494-500 «Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *E. coli*»]. La célula hospedadora puede ser deficiente para una serie de enzimas reductoras, lo que favorece la formación de puentes disulfuro estables tal y como se ejemplificó/describió en Bessette [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1999), 96, 13703-13708 «Efficient folding of proteins with multiple disulphide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm»].

30 En una realización, las células hospedadoras en el contexto de la presente invención incluyen las células que se pueden añadir directamente a un pienso para consumo animal.

## ORGANISMO

35 La terminología «organismo» en relación con la presente invención incluye cualquier organismo que pueda comprender la secuencia de nucleótidos que codifica las enzimas que se describen en la presente invención y/o los productos obtenidos de la misma, y/o en el que un promotor puede permitir la expresión de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la presente invención cuando está presente en el organismo.

Los organismos adecuados incluirían un procariota, hongo, levadura o planta.

40 La terminología «organismo transgénico» en relación con la presente invención incluye cualquier organismo que comprenda la secuencia de nucleótidos que codifica las enzimas que se describen en la presente invención y/o los productos obtenidos de ésta, y/o en el que un promotor puede permitir la expresión en el organismo de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la presente invención. Preferentemente, la secuencia de nucleótidos se incorpora en el genoma del organismo.

La terminología «organismo transgénico» no cubre las secuencias codificantes nucleotídicas nativas en su medio natural cuando están bajo el control de su promotor nativo que también está en su medio natural.

45 Por lo tanto, el organismo transgénico de la presente invención incluye un organismo que comprende una cualquiera, o combinaciones, de la secuencias de nucleótidos que codifica las enzimas que se describen en la presente invención, las construcciones de acuerdo con la presente invención, los vectores de acuerdo con la presente invención, los plásmidos de acuerdo con la presente invención, las células de acuerdo con la presente invención, los tejidos de acuerdo con la presente invención, o sus productos.

50 Por ejemplo, el organismo transgénico también puede comprender la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima

de la presente invención bajo el control de un promotor heterólogo.

#### TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS HOSPEDADORAS/ORGANISMO

Tal y como se indicó anteriormente, el organismo hospedador puede ser un organismo procariota o eucariota. Ejemplos de hospedadores procariotas adecuados incluyen *E. coli* y *Bacillus subtilis*.

- 5 Las enseñanzas sobre la transformación de los hospedadores procariotas están bien documentadas en la técnica, por ejemplo, véase Sambrook et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda edición, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Otros métodos adecuados se presentan en los ejemplos de la presente memoria. Si se utiliza un hospedador procariota, entonces podría ser necesario modificar convenientemente la secuencia nucleotídica antes de la transformación, por ejemplo, retirando los intrones.
- 10 Se pueden transformar células de hongos filamentosos mediante los distintos métodos conocidos en la técnica, tal como un procedimiento que implica la formación de los protoplastos y la transformación de los protoplastos seguida de la regeneración de la pared celular de un modo conocido. El uso de *Aspergillus* como microorganismo hospedador se describe en la patente europea EP 0 238 023.

- Otro organismo hospedador puede ser una planta. Se puede encontrar una revisión de las técnicas generales utilizadas para transformar plantas en los artículos de Potrykus [*Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* (1991) 45: 205-225] y Christou (*Agro-Food-Industry Hi-Tech*, Marzo/abril 1994, 17-27). Más enseñanzas sobre la transformación de las plantas se puede encontrar en la patente europea EP-A-0449375.

En los apartados siguientes se presentan enseñanzas generales sobre la transformación de hongos, levaduras y plantas.

#### 20 HONGOS TRANSFORMADOS

Un organismo hospedador puede ser un hongo, tal como un hongo filamentoso. Ejemplos de tales hospedadores adecuados incluyen cualquier miembro que pertenezca a los géneros *Thermomyces*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Neurospora*, *Trichoderma* y similares.

- 25 Las enseñanzas sobre la transformación de los hongos filamentosos se revisan en la patente de los Estados Unidos US-A-5741665 que afirma que las técnicas estándares para la transformación de los hongos filamentosos y el cultivo de los hongos se conoce bien en la técnica. Una revisión exhaustiva de las técnicas que se aplican a *N. crassa* se encuentra, por ejemplo, en Davis y de Serres, *Methods Enzymol* (1971) 17A:79-143.

Más enseñanzas sobre la transformación de los hongos filamentosos se revisan en la patente de los Estados Unidos US-A-5674707.

- 30 En un aspecto, el organismo hospedador puede ser del género *Aspergillus*, tal como *Aspergillus niger*.

También se puede preparar un *Aspergillus* transgénico de acuerdo con la presente invención siguiendo, por ejemplo, las enseñanzas de Turner G. 1994 («Vectors for genetic manipulation». En: Martinelli S. D., Kinghorn J. R. (Editores) *Aspergillus: 50 years on. Progress in industrial microbiology*, vol. 29. Elsevier, Amsterdam, 1994, págs. 641-666).

- 35 Se ha revisado la expresión génica en los hongos filamentosos en Punt et al., (2002) *Trends Biotechnol*, 2002, mayo, 20(5): 200-6, Archer y Peberdy, *Crit. Rev. Biotechnol.* (1997), 17(4): 273-306.

#### LEVADURA TRANSFORMADA

En otra realización, el organismo transgénico puede ser una levadura.

Una revisión de los principios de la expresión génica heteróloga en la levadura se da a conocer en, por ejemplo, *Methods Mol. Biol.* (1995), 49: 341-54 y *Curr. Opin. Biotechnol.* (1997), Octubre 8(5): 554-60.

- 40 En este sentido, se puede utilizar la levadura, tal como las especies *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris* [véase *FEMS Microbiol. Rev.* (2000), 24(1): 45-66], como un vehículo para la expresión génica heteróloga.

Una revisión de los principios de la expresión génica heteróloga en *Saccharomyces cerevisiae* y la secreción de los productos génicos se ofrece en E. Hinchcliffe E. Kenny (1983, «Yeast as a vehicle for the expression of heterologous genes», *Yeasts*, vol. 5, Anthony H. Rose y J. Stuart Harrison, eds, Segunda edición, Academic Press Ltd).

- 45 Para la transformación de la levadura se han desarrollado varios protocolos de transformación. Por ejemplo, se puede preparar una *Saccharomyces* transgénica de acuerdo con la presente invención siguiendo las enseñanzas de Hinnen et al., (1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 75, 1929); Beggs, J. D. (1978, *Nature*, Londres, 275, 104); e Ito, H. et al. (1983, *J. Bacteriology*, 153, 163-168).

Las células transformadas de levadura se pueden seleccionar mediante diversos marcadores de selección, tales como los marcadores auxótrofos dominantes de resistencia a antibióticos.

#### PLANTAS/CÉLULAS VEGETALES TRANSFORMADAS

- Un organismo hospedador adecuado para la presente invención puede ser una planta. Se puede encontrar una revisión de las técnicas generales en los artículos de Potrykus [*Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* (1991) 42: 205-225] y Christou (*Agro-Food-Industry Hi-Tech*, marzo/abril, 1994, 17-27).

#### CULTIVO Y PRODUCCIÓN

- Las células hospedadoras con la secuencia de nucleótidos de la presente invención se pueden cultivar en condiciones que conducen a la producción de la enzima codificada y que facilitan la recuperación de la enzima a partir de las células y/o del medio de cultivo.

El medio utilizado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para el crecimiento de la célula hospedadora en cuestión y obtener la expresión de la enzima.

La proteína producida por una célula recombinante puede aparecer sobre la superficie de la célula.

- La enzima se puede secretar desde las células hospedadoras y se puede recuperar convenientemente desde el medio de cultivo utilizando los procedimientos bien conocidos.

#### SECRECIÓN

- Puede ser deseable para la enzima que se secrete desde el hospedador de expresión hacia el medio de cultivo donde la enzima se puede recuperar con más facilidad. De acuerdo con la presente invención, la secuencia del péptido líder para la secreción se puede seleccionar en función del hospedador de expresión deseado. También se pueden utilizar secuencias señal híbridas en el contexto de la presente invención.

Ejemplos típicos de secuencias de péptido líder para la secreción heteróloga son las que proceden del gen de la amiloglucosidasa (AG) fúngica (*glaA*, las dos versiones de 18 y 24 aminoácidos, por ejemplo, de *Aspergillus*), el gen de factor  $\alpha$  (levaduras, por ejemplo, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* y *Hansenula*) o el gen de la  $\alpha$ -amilasa (*Bacillus*).

- A modo de ejemplo, la secreción de las proteínas heterólogas en *E. coli* se revisa en *Methods Enzymol.* (1990) 182: 132-43.

#### DETECCIÓN

Se conocen en la técnica muy diversos protocolos para detectar y medir la expresión de la secuencia de aminoácidos. Los ejemplos incluyen el inmunoensayo enzimático (ELISA), el radioinmunoensayo (RIA) y la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

- Los expertos en la técnica conocen una amplia gama de marcadores y técnicas de conjugación y se pueden utilizar en distintos ensayos de aminoácidos y de ácidos nucleicos.

Una serie de compañías tales como Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ), Promega (Madison, WI) y US Biochemical Corp (Cleveland, OH) proporcionan kits comerciales y protocolos para estos procedimientos.

- Las moléculas indicadoras o marcadores adecuados incluyen radionúclidos, enzimas, fluoróforos, quimioluminiscentes o cromógenos, así como sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares. Las patentes que enseñan el uso de tales marcadores incluyen las patentes de los Estados Unidos US-A-3 817 837; US-A-3 850 752; US-A-3 939 350; US-A-3 996 345; US-A-4 277 437; US-A-4 275 149 y US-A-4 366 241.

Igualmente, se pueden producir inmunoglobulinas recombinantes tal y como se muestra en la patente de los Estados Unidos US-A-4 816 567.

- Otros ensayos adecuados para detectar la actividad fitásica se conocen en la técnica y se ejemplifican en la presente memoria.

#### PROTEÍNAS DE FUSIÓN

- La secuencia aminoacídica a utilizar de acuerdo con la presente invención se puede producir como una proteína de fusión, por ejemplo, para ayudar a la extracción y a la purificación. Ejemplos de parejas de proteínas de fusión incluyen glutatión-S-transferasa (GST), cola de hexahistidinas, GAL4 (dominios de fijación al ADN y/o de activación transcripcional) y  $\beta$ -galactosidasa. También puede ser conveniente incluir un sitio de escisión proteolítica entre la proteína fusionada acompañante y la secuencia de la proteína de interés para permitir la retirada de las secuencias de

la proteína fusionada.

Preferentemente, la proteína fusionada no estorbará para la actividad de la secuencia de la proteína.

Se han revisado sistemas de expresión de fusiones génicas en *E. coli* en *Curr. Opin. Biotechnol* (1995) 6(5), 501-6.

- 5 En otra realización de la invención, se puede ligar la secuencia de aminoácidos a una secuencia heteróloga para codificar una proteína de fusión. Por ejemplo, para detectar selectivamente en las colecciones peptídicas los agentes capaces de afectar a la actividad de la sustancia, puede resultar útil codificar una sustancia quimérica que expresa un epítipo heterólogo que es reconocido por un anticuerpo disponible en el mercado.

### OTRAS SECUENCIAS

- 10 Las secuencias a utilizar de acuerdo con la presente invención también se pueden utilizar junto con una o más proteínas de interés (PDI) o secuencias nucleotídicas de interés (NDI) adicionales.

Ejemplos no limitantes de PDI incluyen: xilanasas, lipasas, fosfatasa ácida y/o otras. Estas incluyen ejemplos que, por ejemplo, modulan la viscosidad del pienso. Las NDI pueden incluso ser una secuencia antisentido para cualquiera de las secuencias.

- 15 La PDI puede ser incluso una proteína de fusión, por ejemplo para ayudar a la extracción y purificación o para mejorar el metabolismo del fitato in vivo.

La PDI se puede incluso fusionar a una secuencia para secreción.

Otras secuencias pueden también facilitar la secreción o aumentar la producción de la PDI secretada. Tales secuencias podrían codificar proteínas chaperonas como, por ejemplo, el producto del gen *cypB* de *Aspergillus niger* descrito en la solicitud de patente del Reino Unido 9821198.0.

- 20 La NDI que codifica la PDI se puede modificar genéticamente para que altere su actividad por una serie de razones, que incluyen, pero sin limitarse a ellas, alteraciones, que modifican el procesamiento y/o la expresión del producto de expresión de la misma. A modo de ejemplo adicional, la NDI también se puede modificar para optimizar la expresión en una célula hospedadora particular. Se podrían desear otros cambios en la secuencia para introducir sitios de reconocimiento para enzimas de restricción.

- 25 La NDI que codifica la PDI puede incluir en ella nucleótidos sintéticos o modificados, tales como esqueletos de metilfosfonato y fosforotioato.

- 30 La NDI que codifica la PDI se puede modificar para aumentar su estabilidad intracelular y su semivida. Las modificaciones posibles incluyen, pero sin limitarse a ellas, la adición de las secuencias flanqueantes de los extremos 5' y/o 3' de la molécula o el uso de fosforotioato o 2' O-metilo en vez de enlaces fosfodiéster en el esqueleto de la molécula.

### ANTICUERPOS

Un aspecto de la presente invención se refiere a aminoácidos que son inmunológicamente reactivos contra el aminoácido de SEQ ID n.º 3.

- 35 Se pueden producir anticuerpos mediante técnicas estándares, tales como por inmunización con la sustancia de la invención o con el uso de una genoteca de presentación en fagos.

- 40 Para los propósitos de esta invención, la terminología «anticuerpo», a menos que se especifique lo contrario, incluye, pero sin limitarse a ellos, anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos, monocatenarios, fragmentos Fab, fragmentos producidos por una genoteca de expresión de Fab, así como imitaciones de los mismos. Tales fragmentos incluyen fragmentos de anticuerpos completos que conservan su capacidad de fijación a una sustancia diana, fragmentos Fv, F(ab') y F(ab')<sub>2</sub>, así como anticuerpos monocatenarios (scFv), proteínas de fusión y otras proteínas sintéticas que comprenden el sitio de fijación al antígeno del anticuerpo. Además, los anticuerpos y los fragmentos de los mismos pueden ser anticuerpos humanizados. Los anticuerpos neutralizantes, a saber, los que inhiben la actividad biológica de las sustancias polipeptídicas, se prefieren especialmente para diagnóstico y terapéutica.

- 45 Si se desean anticuerpos policlonales, se inmuniza un mamífero determinado (por ejemplo, ratón, conejo, cabra, caballo, etc.) con la secuencia de la presente invención (o una secuencia que comprende un epítipo inmunitario de la misma). En función de la especie hospedadora se utilizarían distintos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunitaria.

Se recoge el suero del animal inmunizado y se trata de acuerdo con los procedimientos conocidos. Si el suero con los anticuerpos policlonales contra la secuencia de la presente invención (o una secuencia que comprende un epítipo

inmunitario de la misma) contiene anticuerpos contra otros antígenos, los anticuerpos policlonales se pueden purificar mediante cromatografía de inmutafinidad. Las técnicas para producir y procesar antisueros policlonales se conocen en la técnica. Para que tales anticuerpos se puedan construir, la invención también da a conocer polipéptidos de la invención o fragmentos de los mismos haptenizados con otro polipéptido para utilizarlos como inmunógenos en  
5 animales o humanos.

El experto en la técnica también puede producir con facilidad anticuerpos monoclonales dirigidos contra la secuencia de la presente invención (o una secuencia que comprende un epítoto inmunitario de la misma) e incluyen, pero sin limitarse a ellos, la técnica de hibridomas [Koehler y Milstein (1975) *Nature* 256: 495-497], la técnica de hibridomas de linfocitos B humanos [Kosbor et al., (1983) *Immunol Today* 4: 72; Cole et al., (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 2026-2030] y la técnica de hibridomas con el VEB [Cole et al., (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan Rickman Liss Inc, págs. 77-96].  
10

Además, se pueden utilizar técnicas desarrolladas para producir «anticuerpos quiméricos», el empalme de genes de anticuerpos de ratón a genes de anticuerpos humanos para obtener una molécula con una especificidad antigénica y actividad biológica adecuadas [Morrison et al., (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 6851-6855; Neuberger et al., (1984) *Nature*, 312: 604-608; Takeda et al., (1985) *Nature*, 314: 452-454].  
15

Alternativamente, las técnicas descritas para producir anticuerpos monocatenarios (patente de los Estados Unidos n.º 4 946 779) se pueden adaptar para producir la sustancia que son anticuerpos monocatenarios específicos .

También se pueden generar fragmentos de anticuerpo que contienen sitios de fijación específicos para la sustancia. Por ejemplo, tales fragmentos incluyen, pero sin limitarse a ellos, los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> que se pueden producir mediante la digestión de la molécula de anticuerpo con pepsina y los fragmentos Fab que se pueden generar por la reducción de los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Alternativamente, se pueden construir genotecas de expresión de Fab para permitir la identificación rápida y fácil de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada [Huse W. D. et al., (1989) *Science*, 256: 1275-1281].  
20

#### **APLICACIÓN A GRAN ESCALA**

En una realización preferente de la presente invención, la secuencia de aminoácidos que codifica una fitasa procedente de *C. freundii* o los métodos de la presente invención se utilizan para aplicaciones a gran escala. En particular, los métodos de la presente invención se pueden utilizar para la producción a gran escala de fitasas para uso industrial como aditivos o complementos de composiciones alimentarias o de piensos.  
25

Preferentemente, la secuencia de aminoácidos se produce en una cantidad de 5 g/l a unos 10 g/l del volumen total de cultivo celular después de cultivar el organismo hospedador.  
30

Preferentemente, la secuencia de aminoácidos se produce en una cantidad de 100 mg/l a unos 900 mg/l del volumen total de cultivo celular después de cultivar el organismo hospedador.

Preferentemente, la secuencia de aminoácidos se produce en una cantidad de 250 mg/l a unos 500 mg/l del volumen total de cultivo celular después de cultivar el organismo hospedador.

#### **35 USO DE LAS FITASAS**

Tal y como se mencionó anteriormente, la presente invención también se refiere a la producción de fitasas como las descritas en la presente memoria.

En particular, la presente invención también se refiere al uso de las secuencias aminoacídicas que se describen en la presente memoria para la producción de composiciones de fosfato orgánico e inorgánico.

Por esta razón, la presente invención se refiere adicionalmente al uso de las secuencias de nucleótidos que codifican fitasas para la generación de vectores o sistemas de expresión para la expresión de las fitasas.  
40

Además, la presente invención se refiere al uso de tales vectores o sistemas de expresión para la generación de células hospedadoras que expresan fitasas.

La invención se refiere adicionalmente al uso de células hospedadoras modificadas para la generación de precursores de composiciones de fosfato orgánico e inorgánico o para la generación de composiciones de fosfato orgánico específicos.  
45

Las composiciones adecuadas de fosfato orgánico e inorgánico incluyen mioinositol-pentakis-, -tetrakis-, -tris-, -bis- y -monofosfatos.

Por lo tanto, convenientemente, la descripción da a conocer un método para producir una composición de fosfato

- orgánico que comprende tratar un fitato con una fitasa procedente de *Buttiauxella sp.* Preferentemente, el método se caracteriza por comprender la enzima las secuencias de aminoácidos mostradas como SEQ ID n.º 3 o una secuencia que tiene una identidad (homología) de al menos el 75% con ésta o un fragmento eficaz, o una forma modificada de la misma. Convenientemente, el fosfato orgánico es fitato o todos los esteroisómeros posibles de mioinositol-di-, -tri-, -tetra- y -penta-fosfatos. Otros fosfatos orgánicos adecuados incluyen inositol-tetrafosfatos e inositol-oligofosfatos. En una realización preferente, el método es un procedimiento biotecnológico in vivo.

Tales métodos para producir una composición de fosfato orgánico pueden comprender convenientemente las etapas de:

- a) suministrar una célula hospedadora que comprende transgenes expresables que comprenden la fitasa de *Buttiauxella sp.*;
- 10 b) cultivar el organismo transgénico en las condiciones adecuadas para la expresión del transgén; y
- c) recuperar el compuesto de fosfato orgánico a partir del cultivo.

Las composiciones se pueden utilizar en numerosas aplicaciones, que incluyen ensayos para la caracterización de las fitasas. Algunos inositol-fosfatos intervienen como moléculas señalizadoras en la regulación intracelular y se pueden utilizar como sustancias químicas para investigación.

- 15 En otro aspecto se da a conocer un método para producir alimento o pienso para consumo animal. El pienso para consumo animal se produce típicamente en molinos de pienso en los que los materiales brutos primero se muelen hasta un tamaño de partícula adecuado y luego se mezclan con los aditivos adecuados. A continuación se puede generar el pienso como una harina o como granulado; el último típicamente implica un método mediante el cual se aumenta la temperatura hasta un valor deseado y luego se hace pasar el pienso a través de una matriz o troquel para producir
- 20 gránulos de un tamaño determinado. Posteriormente se pueden añadir aditivos líquidos tales como grasa y la enzima. Los gránulos se dejan enfriar antes de transportarlos. La producción de alimento para consumo animal también puede implicar una etapa adicional que incluye la extrusión o expansión antes de la granulación.

- 25 Consecuentemente, la invención además da a conocer el uso de una secuencia de aminoácidos que codifica una fitasa o una célula hospedadora que expresa una fitasa para producir una fitasa que se usará en la fabricación de un alimento o producto para consumo animal. En otro aspecto se da a conocer un uso de una célula hospedadora de acuerdo con la invención para la fabricación de un alimento o producto para consumo animal. En otro aspecto se da a conocer un uso de un vector o sistema de expresión de acuerdo con la invención para la fabricación de un alimento o producto para consumo animal.

- 30 La presente invención también cubre el uso de las enzimas como un componente de combinaciones de piensos con otros componentes para que lo consuman los animales.

### COMBINACIÓN CON OTROS COMPONENTES

Las enzimas de la presente invención se pueden utilizar en combinación con otros componentes o agentes de arrastre.

- 35 Agentes de arrastre adecuados para enzimas para piensos incluyen trigo (molido en granos gruesos). Además, hay una serie de técnicas de encapsulación que incluyen las basadas en la cobertura con grasa/cera, añadir gomas vegetales, etc.

- 40 Ejemplos de otros componentes incluyen uno o más de: espesantes, gelificantes, emulsionantes, aglutinantes, modificadores de cristalización, edulcorantes (incluidos los edulcorantes artificiales), modificadores reológicos, estabilizantes, antioxidantes, colorantes, enzimas, agentes de arrastre, vehículos, excipientes, diluyentes, lubricantes, aromatizantes, colorantes, agentes de suspensión, disgregantes, aglutinantes de granulación, etc. Los otros componentes pueden ser naturales. Los otros componentes se pueden preparar mediante el uso de técnicas químicas y/o enzimáticas.

La terminología «espesantes o gelificante» tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a un producto que impide la separación al entelecer o impedir el movimiento de las partículas, tanto gotitas de líquidos inmiscibles, como aire o sólidos insolubles.

- 45 La terminología «estabilizante» tal y como se utiliza en la presente memoria se define como un ingrediente o combinación de ingredientes que evita que un producto (por ejemplo, un producto alimentario) cambie con el tiempo.

La terminología «emulsionante» tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a un ingrediente (por ejemplo, un ingrediente de producto alimentario) que impide la separación de las emulsiones.

- 50 Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «aglutinante» se refiere a un ingrediente (por ejemplo, un ingrediente alimentario) que aglutina el producto mediante una reacción física o química.

La terminología «modificador de cristalización» tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a un ingrediente (por ejemplo, un ingrediente alimentario) que afecta a la cristalización de la grasa o del agua.

5 «Agentes de arrastre» o «vehículos» significa materiales adecuados para la administración de la composición e incluye cualquier material conocido en la técnica tal como, por ejemplo, cualquier líquido, gel, solvente, diluyente líquido, solubilizante o similares, que no es tóxico y que no interacciona con ningún componente de la composición de un modo perjudicial.

Ejemplos de vehículos nutricionalmente aceptables incluyen, por ejemplo, cereales, agua, soluciones salinas, alcohol, silicona, ceras, vaselina, aceites vegetales y similares.

10 Ejemplos de excipientes incluyen uno o más de: celulosa microcristalina y otras celulosas, lactosa, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato dibásico de calcio, glicina, almidón, azúcar de leche y polietilenglicoles de alta masa molecular.

Ejemplos de disgregantes incluyen uno o más de: almidón (preferentemente almidón de maíz, patata o tapioca), glucolato de almidón sódico, croscarmelosa de sodio y algunos silicatos complejos.

15 Ejemplos de aglutinantes de granulación incluyen uno o más de: polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, maltosa, gelatina y goma arábiga.

Ejemplos de lubricantes incluyen uno o más de: estearato de magnesio, ácido esteárico, behenato de glicerilo y talco.

Ejemplos de diluyentes incluyen uno o más de: agua, etanol, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de los mismos.

20 Los otros componentes se pueden utilizar simultáneamente (por ejemplo, cuando están en una mezcla juntos o incluso cuando se administran mediante vías diferentes) o sucesivamente (por ejemplo, se pueden administrar por vías diferentes).

Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «componente adecuado para el consumo animal o humano» significa un compuesto que es, o que se puede añadir, a la composición de la presente invención como un complemento que puede representar un beneficio nutricional, ser una sustituto de la fibra o tener un efecto que suele ser beneficioso para el consumidor.

25 A modo de ejemplo, los componentes pueden ser prebióticos tales como alginato, xantano, pectina, goma de algarroba (LBG, por sus siglas en inglés), inulina, goma guar, galacto-oligosacárido (GOS), fructo-oligosacárido (FOS), lactosacarosa, oligosacáridos de soja, palatinosa, isomalto-oligosacáridos, glucooligosacáridos y xilooligosacáridos.

### **SUSTANCIA PARA ALIMENTO O PIENSO**

30 Los compuestos se pueden utilizar como una sustancia para alimento o pienso, o utilizarse para la preparación de la misma. Aquí, la terminología «alimento» se utiliza en un sentido amplio y cubre los alimentos y productos alimentarios para consumo humano, así como alimento para animales (por ejemplo, un pienso). La terminología «pienso» se utiliza con referencia para los productos que se dan de comer a los animales en la cría de ganado. En un aspecto preferente, el alimento o pienso es para consumo de animales monogástricos tales como cerdo, aves de corral y peces.

35 El alimento o pienso puede estar en forma de una solución o como un sólido, según el uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

### **INGREDIENTES Y COMPLEMENTOS PARA ALIMENTO Y PIENSO**

Los compuestos se pueden utilizar como un ingrediente para alimento o pienso.

40 Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «ingrediente para alimento o pienso» incluye una formulación que se añade, o que se puede añadir, a los alimentos o los productos alimentarios para consumo humano e incluye formulaciones que se pueden utilizar en poca cantidad en una amplia gama de productos.

El ingrediente para alimento puede estar en forma de una solución o como un sólido, según el uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

Los compuestos pueden ser complementos para alimentos, o se pueden añadir a los mismos.

### **COMPOSICIONES DE ALIMENTOS Y PIENSOS**

45 Las composiciones de piensos para animales monogástricos incluyen típicamente composiciones que comprenden productos vegetales que contienen fitato. Tales composiciones incluyen piensos a base de harina de maíz, harina de soja, harina de colza, harina de semilla de algodón, maíz, trigo, cebada y sorgo.

Las fitasas descritas en la presente invención puede ser sustancias y composiciones de alimentos o piensos, o se pueden añadir a las mismas.

- 5 La presente invención también da a conocer un método para preparar un ingrediente o complemento de alimento o pienso, comprendiendo el método la mezcla de las fitasas producidas por el procedimiento de la presente invención o la composición de acuerdo con la presente invención con otro ingrediente alimentario. El método para la preparación de un ingrediente alimentario también es otro aspecto de la presente invención. Los métodos para preparar el pienso para consumo animal se presentaron más arriba. La enzima se puede añadir también en forma de una formulación sólida, o como un aditivo de pienso, tal como una premezcla. Típicamente, se añade una forma sólida antes o durante la etapa de mezclado; y típicamente se añade una forma líquida después de la etapa de granulación.

#### 10 **SUSTANCIA FARMACÉUTICA**

Las fitasas de la presente invención también se pueden utilizar en las preparaciones farmacéuticas o para la combinación en productos alimentarios para consumo humano para proporcionar cierto efecto farmacéutico. Por ejemplo, la patente europea EP 1 389 915 describe el uso de una fitasa en un alimento o bebida para aumentar la disponibilidad de calcio, hierro y/o cinc del alimento o la bebida para los humanos.

- 15 Además, la patente europea EP 1 392 353 describe un medicamento o complemento nutricional que contiene fitasa, que es útil para aumentar la biodisponibilidad de los bioelementos, por ejemplo calcio y hierro, y para combatir las enfermedades debidas a deficiencias.

- 20 En la presente memoria, la terminología «sustancia farmacéutica» se utiliza en un sentido amplio y cubre las sustancias farmacéuticas y/o los alimentos medicinales para los humanos, así como las sustancias farmacéuticas y/o los alimentos medicinales para los animales (esto es, aplicaciones veterinarias). En un aspecto preferente, la sustancia farmacéutica es para el uso humano y/o para la cría de animales.

La sustancia farmacéutica puede tener propósitos terapéuticos, que pueden ser de naturaleza curativa o paliativa o preventiva. La sustancia farmacéutica puede ser incluso para propósitos diagnósticos.

- 25 Cuando se utilizan como una sustancia farmacéutica, o para su preparación, el producto y/o los compuestos de la presente invención se pueden utilizar junto con uno o más de: un agente de arrastre farmacéuticamente aceptable, un diluyente farmacéuticamente aceptable, un excipiente farmacéuticamente aceptable, un adyuvante farmacéuticamente aceptable, un ingrediente farmacéuticamente activo.

La sustancia farmacéutica puede estar en forma de una solución o como un sólido, según el uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

#### 30 **INGREDIENTE DE SUSTANCIA FARMACÉUTICA**

El producto y/o los compuestos de la presente invención se pueden utilizar como ingredientes de sustancias farmacéuticas. Aquí, el producto y/o la composición de la presente invención puede ser el único componente activo o puede ser al menos uno de una serie (a saber, 2 o más) de componentes activos.

- 35 El ingrediente de sustancia farmacéutica puede estar en forma de una solución o como un sólido, según el uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

El ingrediente de sustancia farmacéutica puede estar en forma de un producto efervescente para mejorar las propiedades de disolución de la sustancia farmacéutica.

#### **FORMAS FARMACÉUTICAS**

- 40 El producto y/o los compuestos de la presente invención se pueden utilizar en cualquier forma farmacéutica adecuada, bien solos o bien presentes en una composición. Así mismo, las fitasas producidas de acuerdo con la presente invención (a saber, ingredientes, tales como ingredientes de alimentos, ingredientes de alimentos funcionales o ingredientes de sustancias farmacéuticas) se pueden utilizar en cualquier forma farmacéutica adecuada.

- 45 Ejemplos de formas farmacéuticas adecuadas incluyen uno o más de: comprimidos, píldoras, cápsulas, óvulos, soluciones o suspensiones, que pueden contener aromatizantes o colorantes, para aplicaciones de liberación inmediata, retrasada, modificada, sostenida, pulsante o controlada.

A modo de ejemplo, si el producto y/o la composición se utilizan en forma de comprimido, tal como para uso como un ingrediente funcional, los comprimidos también pueden contener uno o más de: excipientes, disgregantes, aglutinantes de granulación o lubricantes.

Ejemplos de agentes de arrastre nutricionalmente aceptables a utilizar en la preparación de las formas farmacéuticas incluyen, por ejemplo, agua, soluciones salinas, alcohol, silicona, ceras, vaselina y similares.

Los excipientes preferentes para las formas farmacéuticas incluyen lactosa, almidón, una celulosa, azúcar de leche o polietilenglicoles de alta masa molecular.

- 5 Para las suspensiones acuosas y/o elixires, los compuestos de escisión de carotenoides se pueden combinar con distintos edulcorantes o aromatizantes, colorantes o tintes, con emulsionantes y/o agentes de suspensión y con diluyentes tales como agua, etanol, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de los mismos.

Las formas farmacéuticas también pueden incluir cápsulas de gelatina, cápsulas de fibra, comprimidos de fibra, etc.

### TÉCNICAS METODOLÓGICAS GENERALES DE ADN RECOMBINANTE

- 10 La presente invención emplea, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que se encuentran dentro de las capacidades del experto en la técnica. Tales técnicas se explican en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda edición, libros 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. et al. (1995 y suplementos periódicos), *Current Protocols in Molecular Biology*, cap. 9, 13 y 16, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y.; B. Roe, J. Crabtree y A. Kahn, 1996, *DNA Isolation and Sequencing. Essential Techniques*, John Wiley & Sons; M. J. Gait (editor), 1984, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, Irl Press; y D. M. J. Lilley y J. E. Dahlberg, 1992, *Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology*, Academic Press. Cada uno de estos textos generales se incorporan en la presente memoria por referencia.

#### 20 Ejemplos

La invención ahora se ilustrará adicionalmente mediante los ejemplos no limitantes que siguen.

#### Ejemplo 1. Ensayo de la actividad fitasa

- Se llevaron cabo ensayos de la fitasa en placas de microvaloración. La mezcla de la reacción (100 µl) contenía: fitato a 2 mM y CaCl<sub>2</sub> a 0,8 mM en tampón de acetato de sodio a 200 mM, pH 3,5. Se permitió que la reacción se llevara a cabo durante 1 hora a 37 °C, tras lo cual se midió el fosfato liberado mediante un ajuste de un procedimiento conocido (Heinonen J. K., Lahti R. J. *Anal. Biochem.* 113 (2), 313-317 [1981]). Brevemente, 200 µl de una solución de AMM recién preparada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 7,5 N, molibdato de amonio a 15 mM y acetona, 1:1:2) se añadieron a los 100 µl de la mezcla de reacción en cada pocillo de la placa de microvaloración. Se midió la absorbancia a 390 nm no antes de 10 min ni más allá de 30 min después de añadir el reactivo AMM. Se determinó la cantidad de fosfato al construir una curva de calibración con soluciones de fosfato de concentraciones conocidas. Para ensayar la actividad de la fitasa a diferentes valores del pH, se utilizaron los tampones siguientes (todos a 200 mM): glicina/HCl entre pH 2,0 y 3,0, acetato de sodio/ácido acético entre pH 3,5 y 5,5, Tris/ácido maleico entre pH 6,0 y 7,5.

#### Ejemplo 2. Cepa P1-29 productora de fitasa

- 35 La cepa bacteriana P1-29 se aisló originalmente de una masa de material vegetal en descomposición recogida del fondo de un charco en los bosques del sur de Finlandia. La cepa se puede cultivar aeróbicamente a 30 °C en muchos medios de cultivo simples, por ejemplo LB (peptona al 1%, extracto de levadura al 0,5%, NaCl al 1%, pH 7,4) o el medio bajo en fosfato PP1 (peptona al 1%, extracto carne al 1%, extracto de levadura al 0,5%, CaCl<sub>2</sub> a 0,2 M. Se prepara el medio ajustando el pH a 11 aproximadamente con NaOH y se hierve durante 10 min. Se retira el precipitado por filtración, se reajusta el pH a 5,5 y se esteriliza el medio en la autoclave durante 15 min a 121 °C).

- Después de hacer crecer la cepa en medio PP1 líquido, se encontró que mostraba actividad fitásica a pH 3,5 y a pH 5,5 (ensayada como se describe en el ejemplo 1). La proporción de las actividades a 3,5 y 5,5 fue aproximadamente de 1,3. También se midió por separado la actividad de las células y del sobrenadante del cultivo de P3-42. De acuerdo con estas mediciones, la mayor parte de la actividad fitásica estaba unida a la célula, y de un 10 a un 20% de la actividad se encontró en el sobrenadante del medio de cultivo.

La cepa se depositó en el NCIMB con el n.º de acceso 41248.

#### Ejemplo 3. Aislamiento del ADN cromosómico de la cepa P1-29

- Se preparó ADN cromosómico esencialmente mediante el procedimiento estándar (Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, 1996). Un cultivo de 250 ml que se hizo crecer durante una noche a 30 °C en medio LB se centrifugó a 10 000 rpm durante 30 min, se lavó con 20 ml de tris-HCl a 50 mM, EDTA a 5 mM y

pH 8, y se resuspendió en 10 ml de TES frío (tris-HCl a 50 mM, EDTA a 5 mM, glucosa al 15%, pH 8). Se le añadió la lisozima a 10 mg/ml y se incubó la suspensión celular a 37 °C durante 30 a 60 min hasta que se produjo la lisis, lo que se evaluó mediante la dilución de 100 µl de la mezcla de reacción en 1 ml de SDS al 1% y la comprobación de la consistencia «viscosa». En este momento, se añadieron SDS y proteinasa K (Sigma) a una concentración final del 1% y 0,5 mg/ml, respectivamente. Se incubó la mezcla de reacción durante 30 min a 56 °C y después se le añadieron 2 ml de NaCl a 5 M y 1,4 ml de bromuro de cetiltrimetilamonio (Sigma) al 10%. Se continuó la incubación durante 15 min a 65 °C. Se extrajo la solución una vez con cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y una vez con fenol/cloroformo. Después de las extracciones, se mezcló la fase acuosa con 0,6 vol. de isopropanol, el precipitado de ADN se recogió por centrifugación (10 000 rpm, 15 min), se lavó con etanol al 70%, se secó al vacío y se resuspendió en 2 ml de tris-HCl a 10 mM, EDTA a 1 mM, pH 8, y 5 µg/ml de ARNasa.

#### Ejemplo 4. Identificación taxonómica de la cepa bacteriana P1-29

Se amplificó un fragmento del gen del ARNr 16S de la cepa P1-29 mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con la ADN polimerasa *Taq* (Roche) y los cebadores 536f (CAGCMGCCGCGGTAATWC) y 1392r (ACGGGCGGTGTGTRC), (Lane, D, J. En *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, Stackbrandt, E. y Goodfellow, M. eds, John Willey & Sons, Nueva York: págs. 115-117 [1991]). Se utilizó el programa siguiente: 1) etapa de desnaturalización inicial del ADN de 5 min a 95 °C; 2), 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C, 1 min a 72 °C; 3) etapa de extensión final a 70 °C durante 10 min. Los productos de la PCR, con un tamaño aproximado de 900 pares de bases, se purificaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% y se extrajeron del gel con el kit Gel Purification (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se secuenciaron los productos de PCR purificados en el servicio comercial de Medprobe (Noruega). El área secuenciada se recoge como la SEQ ID n.º 1. Esta secuencia se comparó con las secuencias de ADN de la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Los emparejamientos más altos (688-689 de los 691 nucleótidos, 99,6-99,7%) se encontraron con las secuencias del gen del ARN 16S de varias cepas de *Buttiauxella* tales como *B. izardii* DSM 9397, *B. gaviniae* DSM 9393 y *B. noackiae* ATCC 51607T. Por lo tanto, la cepa P1-29 se puede clasificar taxonómicamente como *Buttiauxella sp.*

#### Ejemplo 5. Clonación del gen de la fitasa de *Buttiauxella sp.* P1-29

El ADN cromosómico de *Buttiauxella sp.* P1-29 se ha digerido parcialmente con la endonucleasa de restricción *Sau3AI* y el digerido se ha fraccionado en un gel de agarosa al 1%. Los fragmentos de ADN de 3 a 5 kb se aislaron del gel utilizando un kit de purificación de gel (Qiagen) y se ligaron con los brazos del λ-ZAP (Stratagene) digeridos con *BamHI* y desfosforilados. Las etapas posteriores para la construcción de la genoteca siguieron las instrucciones del kit de clonación Gigapack con el vector predigerido ZAP Express de Stratagene. La forma de fago de la genoteca se convirtió en una forma plasmídica mediante el procedimiento de «excisión en masa» tal y como describe el fabricante (Stratagene). Se realizó el escrutinio de la genoteca plasmídica de forma similar a como se describe en los métodos publicados anteriormente para la detección de la actividad fitásica sobre placas de Petri [Howson y Davis. *Enzyme Microb. Technol.* 5, 377-382 (1983); Chen J. C. *Biotechnology techniques*, 12 (10), 751-761 (1998); Riccio M. L. et al., *J. Appl. Microbiol.* 82, 177-185 (1997)]. Se aislaron varios clones positivos para la fitasa y se purificaron mediante subclonación. Se hicieron crecer estos aislados en cultivo líquido (medio LB a 30 °C y 200 rpm durante unas 24 h) y se midió la actividad fitásica (ejemplo 1) en las suspensiones celulares resultantes. Se seleccionó un clon que tenía la mayor actividad fitásica (unas 1,2 U/ml a pH 3,5) para la caracterización posterior. Se aisló el ADN plasmídico de este clon, denominado pBK(P1-29) y se caracterizó mediante secuenciación parcial del ADN del inserto [el servicio de secuenciación se obtuvo de Medprobe (Noruega)]. La secuencia que comprende el gen de la fitasa se recoge como SEQ ID n.º 2. La secuencia deducida de la fitasa de *Buttiauxella sp.* P1-29 se recoge como SEQ ID n.º 3. La comparación de la SEQ ID n.º 3 con las secuencias en GenBank utilizando el servicio BLAST proporcionado por el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) identificó que la fitasa de *Obesumbacterium proteus* (n.º de acceso de GenBank AAQ90419) era el homólogo conocido más cercano de la fitasa de *Buttiauxella sp.* P1-29. No obstante, el nivel de homología es más bien bajo: solo aproximadamente el 74% de los restos aminoácidos son idénticos entre ambas proteínas.

#### Ejemplo 6. Amplificación y expresión del gen de la fitasa de *Buttiauxella sp.* P1-29

El gen de la fitasa se amplificó por PCR. Se utilizó el ADN cromosómico de la cepa P1-29 de *Buttiauxella sp.* como plantilla y los oligonucleótidos o29-5 (GGAATTCATATGACGATCTCTGCGTTTAAAC) y o29-3 (GGAATTCGGATCCTTACTGTAGCTGGCAGCCTG) como cebadores. Se llevó a cabo la amplificación utilizando el kit Expand High Fidelity PCR System (Roche). Se utilizó el programa siguiente: 1) desnaturalización inicial del ADN durante 3 min a 94 °C; 2) 35 ciclos de 45 s a 94 °C, 45 s a 55 °C, 1 min a 68 °C, 1 min a 72 °C, 1 min a 74 °C; 3) una etapa final de extensión de 10 minutos a 72 °C. El producto de PCR resultante se purificó por electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% seguido de la extracción del ADN desde el gel utilizando el kit Gel Purification (Qiagen). El producto de PCR purificado se digirió con las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI* y se aisló de la mezcla de reacción mediante el kit PCR Purification (Qiagen). El vector plasmídico pET11a (Novagen) se digirió con las endonucleasas de restricción *NdeI* y *BamHI*, se desfosforiló con la fosfatasa alcalina de gamba (Roche) y se purificó por electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%. La banda de ADN plasmídico linealizado se cortó del gel y se purificó con el kit Gel Purification

(Qiagen). Los dos fragmentos de ADN purificados se ligaron con la ADN ligasa de T4 (Roche). La reacción de ligación se precipitó con etanol al 70%, se lavó con etanol y se resuspendió directamente en 50 µl de células XL1-Blue MRF' de *E. coli* electrocompetentes. La suspensión se transfirió a una cubeta de electroporación de 0,1 cm (BioRad) y se electroporó en un equipo Gene Pulser Xcell (BioRad) a 1800 V, 25 µF y 200 Ω. Inmediatamente después de la electroporación, se añadió 1 ml de medio LB, se transfirió la suspensión celular a un tubo de plástico de 15 ml (Falcon) y se incubó a 37 °C con agitación (200 rpm) durante 1 hora. Las células transformadas se sembraron en placas de LB que contenían 100 µg/ml de ampicilina y se incubaron durante una noche a 37 °C. Se hicieron crecer 24 transformantes en cultivo líquido y se utilizaron los cultivos para ensayar la actividad fitásica y aislar el ADN plasmídico. Se seleccionó un clon que producía la actividad fitásica más alta y que generaba el patrón de restricción esperado del ADN plasmídico. El plásmido que contenía este clon, denominado pET11(P1-29), se utilizó para transformar la cepa hospedadora de expresión BL21(DE3)pLysS (Novagen). La suspensión celular transformada se agitó durante 1 hora a 37 °C en LB que contenía glucosa al 2% y se inoculó en 50 ml de LB con ampicilina (100 µg/ml) y glucosa (2%), y se hizo crecer durante una noche a 30 °C con agitación (200 rpm). La DO del cultivo resultante se midió a 600 nm y se utilizó el cultivo para inocular 11 de LB + ampicilina (100 µg/ml) hasta una DO<sub>600</sub> de 0,04. Se continuó el crecimiento durante una noche a 30 °C. La actividad fitásica de tales cultivos era típicamente de 8 a 12 U/ml. Aproximadamente el 40% de la actividad fitásica se secretaba al medio de cultivo y el resto permanecía asociada a las células. Estas observaciones demuestran que la fitasa de *Buttiauxella* P1-29 se secreta en *E. coli* de un modo algo más eficaz que en su hospedador nativo. La actividad del cultivo de una cepa de control BL21(DE3)pLysS transformada con pET11 que creció en las mismas condiciones estaba por debajo de 0,05 U/ml.

#### 20 Ejemplo 7. Purificación de la fitasa recombinante de *Buttiauxella* P1-29

El cultivo de la cepa BL21(DE3)pLysS transformada con pET11(P1-29) se centrifugó para retirar las células bacterianas, se concentró con un evaporador rotatorio a aproximadamente 1/10 del volumen original y se dializó frente a agua hasta que la conductividad de la solución disminuyó por debajo de 250 µS/cm. Se ajustó el pH de la solución a 8,0 con la base de Tris y se aplicó a una columna (3 x 20 cm) de DEAE Sepharose Fast Flow (Roche) equilibrada con tris-HCl a 25 mM, pH 8,0. La columna se lavó con el tampón de equilibrado a una velocidad de flujo de 3 ml/min durante 30 min y después se eluyó con tres gradientes sucesivos de NaCl en tris-HCl a 25 mM, pH 8,0: 0-50 mM, 50-150 mM y 150-500 mM. Se programó cada uno de los tres gradientes durante 1 hora con un flujo constante de 3 ml/min. Se recogieron fracciones de 9 ml y se les ensayó la actividad fitásica. Se detectó un pico de actividad importante. La proteína de la fracción del pico se concentró usando los concentradores Centriplus (Amicon) y se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS con un gel al 12% y el sistema estándar de tampones de Laemmli. Los resultados de este análisis indicaron que la preparación de la fitasa recombinante de *Buttiauxella* P1-29 obtenida mediante DEAE Sepharose contiene un único componente proteico prominente. Los análisis semicuantitativos que se basan en la exploración de la imagen digital del gel (figura 1) indican que la pureza es de aproximadamente el 65%.

#### Ejemplo 8. Perfil de pH de la fitasa recombinante de *Buttiauxella* P1-29

35 La dependencia del pH que tiene la actividad de la fitasa de *Buttiauxella* P1-29 (purificada siguiendo el ejemplo 7) se estudió en los tampones y en las condiciones que se describen en el ejemplo 1. La enzima era activa en una amplia región de pH (2 a 5,5) con un máximo en torno a pH 4,5 y un notable «hombro» en la curva en torno a pH 3 (figura 2).

#### Ejemplo 9. Especificidad de sustrato de la fitasa recombinante de *Buttiauxella* P1-29

40 Las fracciones de inositol-fosfatos que contienen tres, cuatro o cinco fosfatos por resto de inositol se aislaron mediante cromatografía de intercambio iónico a partir de un hidrolizado parcial de ácido fítico tratado con la fitasa fúngica (Natuphos). La producción y la purificación de estas preparaciones fue un servicio comercial de BioChemis Ltd (St. Petersburgo, Rusia). La contaminación de cada fracción con inositol-fosfatos que tienen un grado de fosforilación diferente fue de menos del 5% según se podía ver por HPLC (Sandberg A. S., Ahderinne R. *J. Food Sci.* 51 (3), 547-550). Se utilizaron fructosa-1,6-bisfosfato y fructosa-6-fosfato comerciales (Sigma) como sustratos modelo para estimar la especificidad de la fitasa de *Buttiauxella* P1-29 con los sustratos bis- y monofosfato. La actividad de la fitasa de *Buttiauxella* purificada de acuerdo con el ejemplo 7 con diferentes sustratos se midió mediante el ensayo estándar (ejemplo 1) a pH 3,5 con concentraciones de sustratos de 2 mM en la mezcla de reacción final. Los resultados (figura 3) indican que la enzima tiene una especificidad de sustrato muy amplia. Su actividad con penta-, tetra- y trifosfatos fue esencialmente igual o algo mayor que la actividad con el ácido fítico como sustrato. Incluso la fructosa-1,6-bisfosfato, un mal sustrato para la mayoría de las fitasas, fue hidrolizado con bastante eficacia por la fitasa de *Buttiauxella* sp. (en particular, la fitasa procedente de P1-29). La hidrólisis de la fructosa-6-fosfato también resultó detectable, aunque fue mucho menos eficaz que la hidrólisis de los otros sustratos analizados.

#### Ejemplo 10. Actividad específica de la fitasa recombinante de *Buttiauxella* P1-29

55 Se estimó la actividad específica de la fitasa de *Buttiauxella* P1-29 con la preparación purificada de acuerdo con el ejemplo 7. Se midió la actividad de la fitasa a pH 3,5 según el ejemplo 1. Se calculó la concentración de la fitasa midiendo la concentración de proteínas totales con el kit de ensayo de proteínas BCA (Pierce) y corrigiéndola por el contenido de fitasa estimado por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (ejemplo 7). Según estas mediciones,

la actividad específica de la fitasa recombinante de *Buttiauxella* P1-29 es de unas 300 U/mg a 37 °C.

**Ejemplo 11. Generación y caracterización de las variantes de la fitasa.**

Se construyeron variantes de la fitasa mediante mutagénesis de la secuencia nucleotídica de la SEQ ID n.º 2 mediante los métodos de mutagénesis que se recogen más arriba, tales como los métodos descritos en Morinaga et al. (5) (*Biotechnology* [1984] 2, págs. 646-649) o en Nelson y Long (*Analytical Biochemistry* [1989], 180, págs. 147-151) o el protocolo de mutagénesis en el umbral de error descrito en la patente internacional WO 92/18645. Otro método adecuado para una PCR mutagénica lo describen Cadwell y Joyce (*PCR Methods Appl.* 3 [1994], 136-140).

Se caracterizaron las variantes de la enzima fitasa después de la expresión heteróloga en uno o más de los hospedadores de expresión siguientes: *Escherichia coli* K12; *Bacillus subtilis*; *Saccharomyces cerevisiae*.

10 Se obtuvieron variantes de la fitasa que diferían en una o más posiciones de aminoácidos de la SEQ ID n.º 3, incluidas dos posiciones, tres posiciones, cuatro posiciones, cinco posiciones, seis posiciones, siete posiciones, ocho posiciones, nueve posiciones, diez posiciones, once posiciones, doce posiciones. Cuando resultó conveniente, se realizaron ciclos iterativos de mutagénesis, como se describe en la presente memoria.

Caracterización de las variantes de la fitasa

15 1. Termoestabilidad

La termoestabilidad de tales variantes se caracterizó mediante la inactivación de la enzima con la temperatura. La temperatura de inactivación se determinó midiendo la actividad residual de la enzima fitasa después de la incubación durante 10 min a diferentes temperaturas y el posterior enfriamiento hasta la temperatura ambiente. La temperatura de inactivación es la temperatura a la que la actividad residual es un 50% de la actividad residual después de la incubación (20) para la misma duración en las mismas condiciones a temperatura ambiente. Cuando era conveniente, se realizaron interpolaciones y extrapolaciones a partir de los datos de actividad medidos para determinar la temperatura que corresponde a la actividad residual del 50%. Las diferencias de termoestabilidad en grados Celsius se calcularon al sustraer entre sí las temperaturas de inactivación de las dos enzimas.

La tabla 1 recoge las diferencias de termoestabilidad de diferentes variantes:

25

TABLA 1:

Diferencias de termoestabilidad (DT) para las variantes obtenidas de la fitasa madre mostrada en la SEQ ID n.º 3	
Variante	DT
K59E	2,5
T167V	2,5
K240T	2,1
T167I	3,0
K240E	3,3
D244	4,2
Q289Y	4,4
T209K	1,8
F197S	1,0
D125E/H193R	1,5
A294E/N303K	3,5
T167I/K240T	4,1
D223E/K240E/N351D	2,7
T167I/K240T/A294E/N303K	6,1

T167I/K240E/A242S/A294E/N303K	8,2
A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A294E/N303K	11,5
A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A242S/S281L/Q289Y/A294E/N303K	15,2
A122T/D125E/H193R/F197S/T209K/A211P/S221N/G225A/K240E/A294E/N303K	12,0
D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K	16,5
A122T/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K/I336F	17,7
N70Y/D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K	20,2

2. Otras características

También se mejoraron otras características.

- 5 Se compararon la termoestabilidad, la actividad específica y la estabilidad frente a la pepsina de las variantes seleccionadas mediante ensayos como los descritos más arriba. La estabilidad frente a la pepsina de tales variantes se caracterizó mediante las actividades residuales medidas a pH 3,5 y 37 °C después de la incubación con pepsina en comparación con las condiciones de control (actividad residual = actividad después de la incubación con la pepsina/actividad después de la incubación en las condiciones de control). La incubación con la pepsina se llevó a cabo durante 2 horas a pH 2,0, pepsina a 0,25 mg/ml, CaCl<sub>2</sub> a 1 mM y BSA a 5 mg/ml a 37 °C. Las condiciones de control eran 2 horas a pH 5,0, CaCl<sub>2</sub> a 1 mM y BSA a 5 mg/ml a 37 °C.
- 10

La tabla 2 muestra las propiedades de las variantes seleccionadas (derivadas de la fitasa de tipo salvaje de acuerdo con la SEQ ID n.º 3 y comparadas con ella).

TABLA 2:

Estabilidad frente a la pepsina de las variantes obtenidas de la fitasa madre mostrada en la SEQ ID n.º 3	
Variante	Estabilidad de la pepsina [% de actividad residual]
A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A294E/N303K	63
A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A242S/S281L/Q289Y/A294E/N303K	72
A122T/D125E/H193R/F197S/T209K/A211P/S221N/G225A/K240E/A294E/N303K	34
D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K	62
A122T/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K/I336F	61
N70Y/D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K	77

TABLA 3:

Actividad específica de una variante obtenida de la fitasa madre mostrada en la SEQ ID n.º 3:	
Variante	Actividad específica [% de la actividad del tipo salvaje a pH 4,0]
A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A242S/S281L/S289Y/A294E/N303K	115

Diferentes modificaciones y variaciones de los métodos descritos resultarán evidentes para los expertos en la técnica.

5 SEQ ID n.º 1

ACTACGACGCACTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGTTCTCT  
 TTGTATGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGA  
 TGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCT  
 TTGAGTTCCCGGCCGAACCGCTGGCAACAAAGGATAAAGGTTGCGCTCGT  
 10 TGCGGGACTTAACCCAACATTTACAAACACGAGCTGACGACAGCCATGCA  
 GCACCTGTCTCACAGTTCCCGAAGGCACTAAGGCATCTCTGCCAAATTCT  
 GTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAAACCA  
 CATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTAAACC  
 TTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTGACTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGC  
 15 CACTCCTCAAGGGAACAACCTCCAAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACT  
 ACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTC  
 AGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCTCCAGATCTCT  
 ACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTA  
 GCCTGCCAGTTTCGAATGCAGTTCCAGGTTGAGCCCGGGG

20 SEQ ID n.º 2:

TTTCACATAGCAAACAACAACGAGACGAACTCGACGTTACCGCTTTGCTT

CTGGAGTATATTTATCAGACTCAAACACCCCAAAGAAAAGAGGCTGTAAA  
 TGACGATCTCTGCGTTTAACCGCAAAAAACTGACGCTTCACCCTGGTCTG  
 TTCGTAGCACTGAGCGCCATATTTTCATTAGGCTCTACGGCCTATGCCAA  
 CGACACTCCCGCTTCAGGCTACCAGGTTGAGAAAGTGGTAATACTCAGCC  
 5 GCCACGGGGTGCAGACCAACCAAAATGACACAGACCATGCGCGACGTA  
 ACACCTAATACCTGGCCCGAATGGCCAGTAAAATTGGGTTATATCACGCC  
 ACGCGGTGAGCATCTGATTAGCCTGATGGGCGGGTTTTATCGCCAGAAGT  
 TTCAACAACAGGGCATTTTATCGCAGGGCAGTTGCCCCACACCAAACCTCA  
 ATTTATGTCTGGGCAGACGTTGATCAGCGCACGCTTAAAACCTGGCGAAGC  
 10 TTTCTGGCAGGGCTTGCTCCGGAATGTCATTTAACTATTCACCACCAGC  
 AGGACATCAAAAAGCCGATCCGCTGTTCCATCCGGTGAAAGCGGGCACC  
 TGTTC AATGGATAAAACTCAGGTCCAACAGGCCGTTGAAAAGAAGCTCA  
 AACCCCATTGATAATCTGAATCAGCACTATATTCCCTTTCTGGCCTTGA  
 TGAATACGACCCTCAACTTTTCGACGTCGGCCTGGTGTCAGAAACACAGC  
 15 GCGGATAAAAGCTGTGATTTAGGGCTATCCATGCCGAGCAAGCTGTTCGAT  
 AAAAGATAATGGCAACAAAGTCGCTCTCGACGGGGCCATTGGCCTTTCGT  
 CTACGCTTGCTGAAATTTTCCTGCTGGAATATGCGCAAGGGATGCCGCAA  
 GCGGCGTGGGGGAATATTCATTCAGAGCAAGAGTGGGCGTCGCTACTGAA  
 ACTGCATAACGTCCAGTTTGATTTGATGGCACGCACGCCTTATATCGCCA  
 20 GACATAACGGCACGCCTTTATTGCAGGCCATCAGCAACGCGCTGAACCCG  
 AATGCCACCGAAAGCAAACCTGCCTGATATCTCACCTGACAATAAGATCCT  
 GTTTATTGCCGGACACGATACCAATATTGCCAATATCGCAGGCATGCTCA  
 ACATGCGCTGGACGCTACCTGGGCAACCCGATAACACCCCTCCGGGCGGC

GCTTTAGTCTTTGAGCGTTTGGCCGATAAGTCAGGGAAACAATATGTTAG  
CGTGAGCATGGTGTATCAGACTCTCGAGCAGTTGCGCTCCCAAACACCAC  
TTAGCCTTAATCAACCTGCGGGAAGCGTACAGCTAAAAATTCCTGGCTGT  
AACGATCAGACGGCTGAAGGATACTGCCCGCTGTTCGACGTTCACTCGCGT  
5 GGTTAGCCAAAGCGTGAACCAGGCTGCCAGCTACAGTAAATATCAGACA  
AAAAAATGCCGCTCGCGATTAAGCGAACGGCATTACTTCCTAGCTTCCC  
AGCTCGGATTAGCATGGCGAGAGCCGAAAAACTT

SEQ ID n.º 3

10 MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLGSTAYANDTPASGYQVEKVVILS  
RHGVRAPTKMTQTMRDVTPNTWPEWPVKLGYYITPRGEHLISLMGGFYRQK  
FQQQGILSQGSCPTPNSIYVWADVQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHHQ  
QDIKKADPLFHPVKAGTCSMDKTQVQQAVEKEAQTPIDNLNQHYIPFLAL  
MNTTLNFSTSAWCQKHSADKSCDLGLSMPKLSIKDNGNKVALDGAIGLS  
15 STLAEIFLLEYAQGMPQAAWGNHSEQEWASLLKLHNVQFDLMARTPYIA  
RHNGTPLLQAISNALNPNATESKLPDISPDNKILFIAGHDTNIANIAGML  
NMRWTLPGQPDNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLEQLRSQTP  
LSLNQPAGSVQLKIPGCNDQTAEGYCPLSTFTRVVSQSVEPGCQLQ

## REIVINDICACIONES

1. Polipéptido seleccionado entre el grupo que consiste en:

- un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID n.º 3 o una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 80% con ésta;

5 • un polipéptido que se puede obtener de la cepa P1-29 de *Buttiauxella sp.* depositada con el número de acceso NCIMB 41248;

- un polipéptido que se puede obtener mediante la expresión de la SEQ ID n.º 2 o de una secuencia de nucleótidos que se puede obtener de la cepa P1-29 de *Buttiauxella sp.* depositada con el número de acceso NCIMB 41248 o de una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80% con ésta; y

10 • un polipéptido que se puede obtener de la cepa P1-29 de *Buttiauxella sp.* depositada con el número de acceso NCIMB 41248 y en el que el péptido se puede obtener mediante la expresión de la SEQ ID n.º 2 o de una secuencia de nucleótidos que se puede obtener de la cepa P1-29 de *Buttiauxella sp.* depositada con el número de acceso NCIMB 41248 o una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80% con ésta,

15 en donde dicho polipéptido tiene actividad fitásica, en donde dicho polipéptido tiene una actividad específica de al menos 300 U/mg, en donde dicha actividad específica se determina por la incubación de dicho polipéptido en una solución que contiene fitato a 2 mM, CaCl<sub>2</sub> a 0,8 mM en tampón de acetato de sodio a 200 mM a pH 3,5, a una temperatura de 37 °C.

2. Polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido está aislado y/o purificado.

20 3. Polipéptido de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que dicho polipéptido tiene una actividad máxima en torno a pH 3 a 6, en donde dicha actividad se determina por la incubación de dicho polipéptido en una solución que contiene fitato a 2 mM, CaCl<sub>2</sub> a 0,8 mM en tampón de acetato de sodio a 200 mM a una temperatura de 37 °C.

25 4. Polipéptido de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que dicho polipéptido tiene una actividad máxima en torno a pH 4 a 5, en donde dicha actividad se determina por la incubación de dicho polipéptido en una solución que contiene fitato a 2 mM, CaCl<sub>2</sub> a 0,8 mM en tampón de acetato de sodio a 200 mM a una temperatura de 37 °C.

5. Polipéptido de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que dicho polipéptido tiene una actividad máxima en torno a pH 4,5, en donde dicha actividad se determina por la incubación de dicho polipéptido en una solución que contiene fitato a 2 mM, CaCl<sub>2</sub> a 0,8 mM en tampón de acetato de sodio a 200 mM a una temperatura de 37 °C.

30 6. Polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende mutaciones en al menos una de las posiciones siguientes, numeradas según la numeración de la SEQ ID n.º 3: K 59, T 70, A 122, D 125, T 167, H 193, F 197, T 204, T 209, A 211, S 221, I 223, S 225, K 240, A 242, D 244, A 268, S 281, Q 289, A 294, N 303, I 336 o N 351.

35 7. Polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho polipéptido comprende una o más de las siguientes mutaciones:

K 59 A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y;

o

T 70 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, o Y;

o

40 A 122 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y;

o

D 125 A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y;

o

T 167 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, o Y;

45 o

H 193 A, C, D, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y;

o

F 197 A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y;

o

5 T 204 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, o Y;

o

T 209 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W, o Y;

o

A 211 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y;

10 o

S 221 A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y;

o

D 223 A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y;

o

15 G 225, A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, o Y;

o

K 240 A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y;

o

A 242 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y;

20 o

D 244 A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y;

o

A 268 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y;

o

25 S 281 A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y;

o

Q 289 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, o Y;

o

A 294 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y;

30 o

N 303 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, o Y;

o

I 336 A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y;

o

35 N 351 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, o Y.

8. Polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende al menos una mutación seleccionada entre el grupo que consiste en: K59E; T167V; K240T; T167I; K240E; D244C; Q289Y; T209K o F197S.

9. Polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende una combinación de mutaciones seleccionadas entre el grupo que consiste en:

- 5 D125E/H193R; o  
A294E/N303K; o  
T167I/K240T; o  
D223E/K240E/N351D; o  
T167I/K240T/A294E/N303K; o
- 10 T167I/K240E/A242S/A294E/N303K; o  
A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A294E/N303K; o  
A22T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A242S/S281L/Q289Y/A294E/N303K; o  
A122T/D125E/H193R/F197S/T209K/A211P/S221N/G225A/K240E/A2944E/N303K; o  
D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q2891H/A294E/N303K; o
- 15 A122T/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K/I336F; o  
N70Y/D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K.
10. Polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende la combinación de mutaciones:  
A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A242S/S281L/Q289Y/A294E/N303K.
- 20 11. Polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en donde dicho polipéptido aislado es una variante de la enzima fitasa que tiene una termoestabilidad mayor y/o una actividad específica mayor y/o una estabilidad proteolítica mayor que la enzima fitasa codificada por la SEQ ID n.º 2.
12. Polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la secuencia de aminoácidos tiene una identidad de al menos el 85% con la SEQ ID n.º 3.
- 25 13. Polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la secuencia de aminoácidos tiene una identidad de al menos el 90% con la SEQ ID n.º 3.
14. Polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la secuencia de aminoácidos tiene una identidad de al menos el 95% con la SEQ ID n.º 3.
15. Polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la secuencia de aminoácidos tiene una identidad de al menos el 96% con la SEQ ID n.º 3.
- 30 16. Polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la secuencia de aminoácidos tiene una identidad de al menos el 97% con la SEQ ID n.º 3.
17. Polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la secuencia de aminoácidos tiene una identidad de al menos el 98% con la SEQ ID n.º 3.
- 35 18. Polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la secuencia de aminoácidos tiene una identidad de al menos el 99% con la SEQ ID n.º 3.

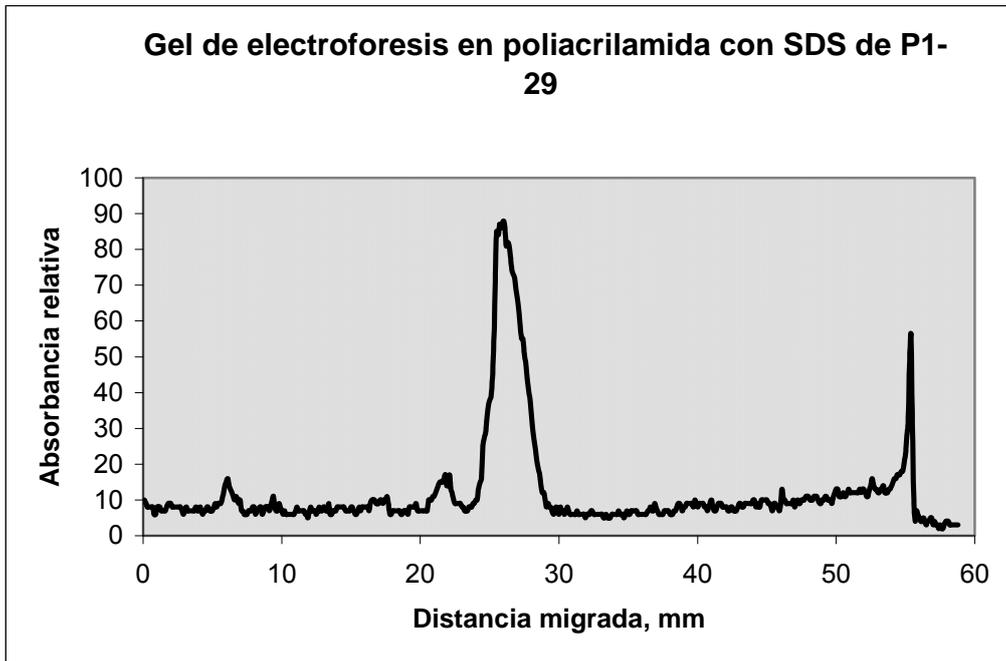


Figura 1

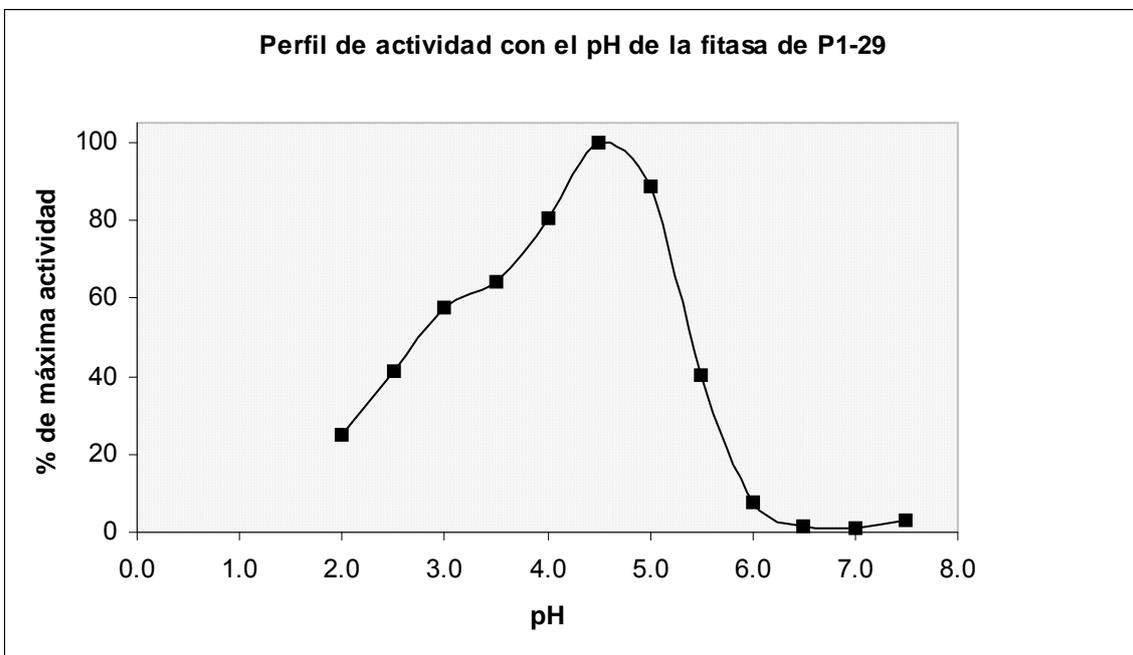


Figura 2.

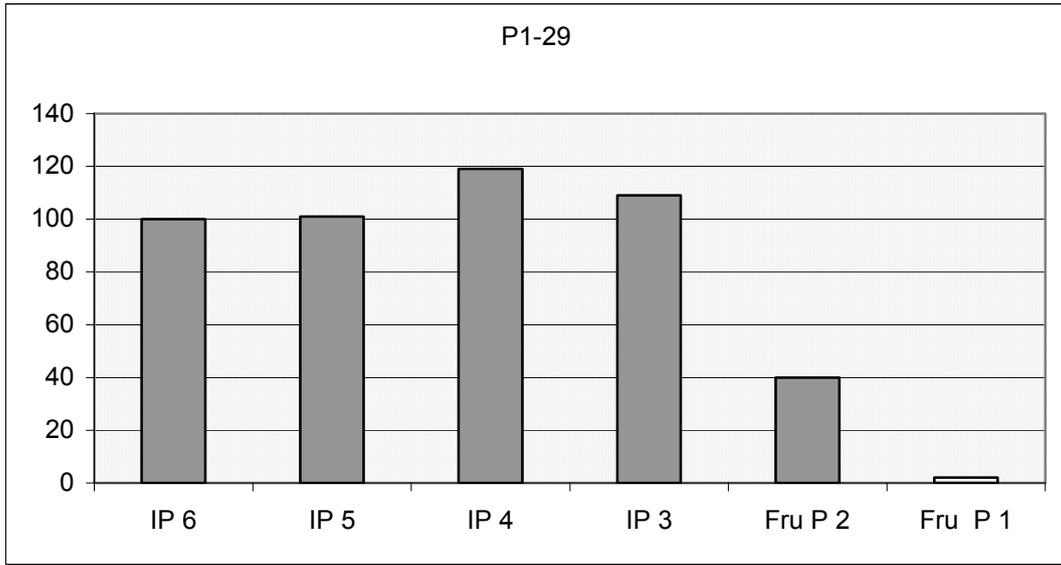


Figura 3