

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 908**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/16** (2006.01)  
**A23K 1/18** (2006.01)  
**A23K 1/165** (2006.01)  
**C12N 15/55** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)  
**C12N 1/14** (2006.01)  
**C12N 1/20** (2006.01)  
**C12R 1/01** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2005 E 05804336 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **20.06.2007 EP 1797178**

54 Título: **Fitasa de citrobacter freundii y homólogos**

30 Prioridad:

**04.10.2004 GB 0422052**  
**15.02.2005 WO PCT/IB2005/000598**

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

**06.02.2013**

73 Titular/es:

**DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS**  
**(100.0%)**  
**Langebrogade 1, Postboks 17**  
**1001 Copenhagen K. , DK**

72 Inventor/es:

**MIASNIKOV, ANDREI;**  
**KUMAR, VIJAY;**  
**KENSCH, OLIVER;**  
**PELLANGAHR, KLAUS;**  
**LEUTHNER, BIRGITTA;**  
**KETTLING, ULRICH y**  
**KOLTERMANN, ANDRE**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 394 908 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

Fitasa de *Citrobacter freundii* y homólogos

La presente invención se refiere a fitasas, secuencias de nucleótidos para las mismas, procedimientos de producción de fitasas y a su uso.

### 5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al campo de enzimas para aditivos a piensos. Más específicamente, la presente invención se refiere a fitasas que pueden usarse para potenciar la digestión de fosfato en alimentos y piensos animales.

### ANTECEDENTES TÉCNICOS Y TÉCNICA ANTERIOR

10 El fitato es la principal forma de almacenamiento de fósforo en cereales y legumbres. Sin embargo, los animales monogástricos tales como cerdos, aves de corral y pescado no pueden metabolizar o absorber el fitato (o ácido fítico) y, por tanto, es secretado conduciendo a la polución fosforosa de áreas de intensa producción ganadera. Además, el ácido fítico también actúa de agente antinutritivo en animales monogástricos quelando agentes metálicos tales como calcio, cobre y cinc.

15 Con el fin de proporcionar fosfatos suficientes para el crecimiento y la salud de estos animales, a sus dietas se añade fosfato inorgánico. Tal adición puede ser costosa y además aumenta los problemas de polución.

El fitato es convertido por fitasas que generalmente catalizan la hidrólisis del fitato a fosfatos de inositol inferiores y fosfato orgánico. Las fitasas son útiles como aditivos para piensos animales en los que mejoran la disponibilidad de fósforo orgánico para el animal y disminuyen la polución de fosfato del entorno (Wodzinski RJ, Ullah AH. *Adv Appl Microbiol.* 42, 263-302 (1996)).

25 En la bibliografía se han descrito varias fitasas de origen fúngico (Wyss M. y col. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (2), 367-373 (1999); Berka R.M. y col. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (11), 4423-4427 (1998); Lassen S. y col. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (10), 4701-4707 (2001)) y bacteriano (Greiner R. y col. *Arch. Biochem. Biophys.* 303 (1), 107-113 (1993); Kerovuo y col. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (6), 2079-2085 (1998); Kim H.W. y col. *Biotechnol. Lett.* 25, 1231-1234 (2003); Greiner R. y col. *Arch. Biochem. Biophys.* 341 (2), 201-206 (1997); Yoon S.J. y col. *Enzyme and microbial technol.* 18, 449-454 (1996); Zinin N.V. y col. *FEMS Microbiol. Lett.* 236, 283-290 (2004)).

30 Sin embargo, hasta la fecha, ninguna de estas fitasas ha mostrado las propiedades requeridas para el uso eficaz como suplemento para piensos animales. En particular, las fitasas fúngicas tienden a ser proteolíticamente inestables (Igbasan F.A. y col. *Arch. Anim. Nutr.* 53,353-373 (2000)) y, por tanto, susceptibles a degradación, mientras que la mayoría de las fitasas bacterianas tienen una estrecha especificidad de sustrato por el fitato solo y degradan escasamente los fosfatos de inositol de grados intermedios de fosforilación (Greiner R. y col., *Arch. Biochem. Biophys.* 303 (1), 107-113 (1993); Kerovuo J y col. *Biochem. J.* 352, 623-628 (2000)).

Por consiguiente, existe la necesidad de fitasas mejoradas.

### RESUMEN DE LA INVENCION

35 En un amplio aspecto, la presente invención se refiere a fitasas derivadas de una bacteria y formas modificadas de la misma. En particular, la invención se refiere a fitasas naturales derivadas de la bacteria *Citrobacter freundii* y a formas variantes/modificadas de las mismas que muestran características mejoradas con respecto a la enzima natural.

40 La presente invención es ventajosa, ya que proporciona fitasas novedosas que tienen propiedades que las hacen particularmente útiles y eficientes como enzimas para pienso. En particular, la invención se refiere a polipéptido de fitasa novedoso aislado y/o purificado como se describe en el presente documento o fragmentos o variantes funcionales o formas modificadas del mismo. La invención también proporciona las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos que codifican dichas fitasas.

45 Para ser eficiente como aditivo de enzima para alimento o pienso animal, una fitasa tiene que combinar varias propiedades diferentes. Con el fin de poder degradar el ácido fítico en el entorno ácido de un estómago de animal tiene que ser activo a bajo pH, preferentemente durante un amplio intervalo de valores de pH. Además, tiene que tener alta actividad específica y preferentemente alta termoestabilidad para permitir que la proteína resista a las altas temperaturas comúnmente usadas en la preparación de piensos tales como gránulos de pienso.

50 También es importante que la enzima tenga amplia especificidad por sustrato que permite que se hidrolice no sólo el fitato, sino también productos intermedios de la degradación del fitato tales como pentafosfatos, tetrafosfatos y trifosfatos de inositol. Estudios sobre la degradación del fitato en cerdos muestran que estos oligofosfatos de inositol

siguen siendo por lo demás ampliamente insolubles en el intestino delgado y grueso y, por tanto, inaccesibles a fosfatasa alcalinas producidas por el animal y la microflora intestinal (Schlemmer U. y col. Arch. Anim. Nutr. 55, 255-280 (2001)). Se han identificado variaciones en los perfiles de especificidad del sustrato de diferentes enzimas. Por ejemplo, los trifosfatos de inositol generados por la fitasa de *B. subtilis* son esencialmente resistentes a la posterior hidrólisis por esta enzima (Kerovuo J. y col. Biochem J. (200) 352, 623-628).

En otro aspecto de la invención se proporciona un plásmido o un sistema de vector o un organismo transformado o transgénico que comprende una fitasa novedosa como se describe en el presente documento o una forma modificada del mismo.

En otro aspecto la presente invención se refiere a organismos transgénicos modificados para expresar una fitasa novedosa como se describe en el presente documento o una forma modificada de la misma y que, por tanto, pueden producir una fitasa. La presente invención proporciona además medios y procedimientos para la producción biotecnológica de fitasas y su uso como suplementos para piensos.

Los aspectos de la presente invención se presentan en las reivindicaciones y en el siguiente comentario.

Para facilidad de referencia, estos y otros aspectos de la presente invención se tratan ahora bajo encabezamientos de sección apropiados. Sin embargo, las enseñanzas bajo cada sección no están necesariamente limitadas a cada sección particular.

Como se usa con referencia a la presente invención, los términos “producen”, “producir”, “producido”, “producible”, “producción” son sinónimos a los términos respectivos “preparar”, “preparando”, “preparado”, “preparación”, “generado”, “generación” y “preparable”.

Como se usa con referencia a la presente invención, los términos “expresión”, “expresa”, “expresado” y “expresable” son sinónimos a los términos respectivos “transcripción”, “transcribe”, “transcrito” y “transcribible”.

Como se usa con referencia a la presente invención, los términos “transformación” y “transfección” se refieren a un procedimiento de introducción de secuencias de ácidos nucleicos en huéspedes, células huésped, tejidos u órganos.

Otros aspectos referentes a las secuencias de nucleótidos que pueden usarse en la presente invención incluyen: una construcción que comprende las secuencias de la presente invención; un vector que comprende las secuencias para su uso en la presente invención; un plásmido que comprende las secuencias para su uso en la presente invención; una célula transformada que comprende las secuencias para su uso en la presente invención; un tejido transformado que comprende las secuencias para su uso en la presente invención; un órgano transformado que comprende las secuencias para su uso en la presente invención; un huésped transformado que comprende las secuencias para su uso en la presente invención; un organismo transformado que comprende las secuencias para su uso en la presente invención. La presente invención también engloba procedimientos de expresión de la secuencia de nucleótidos para su uso en la presente invención usando los mismos, tales como expresión en una célula huésped; que incluyen procedimientos para transferir la misma. La presente invención engloba adicionalmente procedimientos de aislamiento de la secuencia de nucleótidos, tales como aislamiento de una célula huésped.

Otros aspectos referentes a las secuencias de aminoácidos para su uso en la presente invención incluyen: una construcción que codifica las secuencias de aminoácidos para su uso en la presente invención; un vector que codifica las secuencias de aminoácidos para su uso en la presente invención; un plásmido que codifica las secuencias de aminoácidos para su uso en la presente invención; una célula transformada que expresa las secuencias de aminoácidos para su uso en la presente invención; un tejido transformado que expresa las secuencias de aminoácidos para su uso en la presente invención; un órgano transformado que expresa las secuencias de aminoácidos para su uso en la presente invención; un huésped transformado que expresa las secuencias de aminoácidos para su uso en la presente invención; un organismo transformado que expresa las secuencias de aminoácidos para su uso en la presente invención. La presente invención también engloba procedimientos de purificación de las secuencias de aminoácidos para su uso en la presente invención usando los mismos, tales como expresión en una célula huésped; que incluyen procedimientos de transferir las mismas, y luego purificar dichas secuencias.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Figura 1** muestra análisis de SDS-PAGE de la fitasa recombinante de P3-42 de *C. freundii* purificada por cromatografía en DEAE-Sepharose. La figura presenta la traza de barrido de una imagen fotográfica digital del carril que contiene una muestra de la fitasa de *C. freundii*.

La **Figura 2** muestra el perfil de pH de la fitasa de P3-42 de *C. freundii*

La **Figura 3** muestra la especificidad de sustrato de la fitasa recombinante purificada de P3-42 de *C. freundii* con fracciones de fosfatos de inositol de diferente grado de fosforilación y sustratos modelo. Abreviaturas: IP6 - ácido fítico, IP5, IP4 e IP3 - mezclas de penta-, tetra- y trifosfatos de inositol isoméricos, respectivamente. Fru P2 - 1,6-

difosfato de fructosa, *Fru P1* - 6-fosfato de fructosa.

SEC ID N°: 1 enumera la secuencia obtenida para la identificación de la cepa bacteriana.

SEC ID N°: 2 enumera la secuencia que comprende el gen de fitasa de P3-42 de *C. freundii*.

SEC ID N°: 3 enumera la secuencia de aminoácidos del gen de fitasa de P3-42 de *C. freundii*.

## 5 DIVULGACIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención caracteriza una enzima que comprende la secuencia de aminoácidos correspondiente a fitasa de *Citrobacter freundii* o una forma modificada, una variante, un equivalente funcional o un fragmento eficaz de la misma.

La presente invención se describe adicionalmente en los siguientes párrafos enumerados:

- 10 1. Un polipéptido de fitasa aislado que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEC ID N°: 3 correspondiente a fitasa de *Citrobacter freundii* o una secuencia que tiene al menos el 90% de identidad (homología) con la misma; en el que dicho polipéptido comprende

una combinación de mutaciones seleccionada del grupo que consiste en: R288M; K46E/Q82H/E168D/Q274L; Q82K/T1S4I/Q279E/N308T; Q82R/D112V/Q274H/T362A; DS3N/D57Y/T199I/P229S/R288M; K46E/Q82H/N148D/T154I/T362I; D53N/D57Y/P229S/R288M/K358R; D53N/D57Y/T154I/P229S/R288M; K46E/Q82H/N95D/D112V/K142R/D383V; D53N/D57Y/M152V/P229S/R288M/A393P; D53N/D57Y/M152V/P229S/R288M/A393P; D53N/D57Y/F88Y/M152V/P229S/Q279E/N308T; D53N/D57Y/M152V/T154I/P229S/R288M/A393P; D53N/D57Y/Q82H/G103E/M152V/P229S/R288M/A393P; K46E/D53N/D57Y/T143I/M152V/L176V/P229S/R288M/A393P; Q82K/F88Y/N96P/Q97T/T98G/V105I/Q274H/Q279E/A393P; Q82R/F88Y/N95P/N96P/Q97T/Q279E/I384L/P386Q/A393P; H18Q/D53N/D57Y/E75V/M152V/A170T/P229S/R288M/Q385R/A393P; Q82K/F88Y/N96P/T98G/Y136N/M152V/Y177F/T362I/I384F/A393P/D397N; D53N/D57Y/F88Y/N95P/N96P/V105I/D112V/Y136N/N148D/N164D/Q274H/T362I/I384L/A393P; D53N/D57Y/Q82K/F88Y/N95P/P102L/V105I/Y136N/N148D/Y177F/Q274H/Q279E/T362I/A393P; D53N/D57Y/Q82K/F88Y/N96P/T98G/V105I/D112V/Y177F/Q274L/G343A/T362I/I384L/A393P; E23K/K46E/Q82H; K46E/Q82H/Q385R; D53N/D57Y/E75V/M152V/A170T/P229S/R288M/Q385R/A393P;

- 20 30 numeradas según la numeración en SEC ID N°: 3, y en el que el polipéptido aislado tiene elevada termoestabilidad en comparación con un polipéptido que tiene la secuencia explicada en SEC ID N°: 3.

2. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido según el párrafo 1.

3. Una molécula de ácido nucleico aislada según el párrafo 2 que codifica el polipéptido aislado o fitasa como se describe en el párrafo 1.

- 35 4. Un plásmido o sistema de vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido aislado o fitasa como se describe en el párrafo 1.

5. Un plásmido o sistema de vector como se describe en el párrafo 4 que comprende una secuencia de ácidos nucleicos como se describe en cualquiera de los párrafos 2 a 3.

- 40 6. Un plásmido o sistema de vector como se describe en los párrafos 4 ó 5 en el que dicho plásmido o sistema de vector es un vector de expresión para la expresión del polipéptido aislado o enzima fitasa en una célula huésped o un microorganismo.

7. Una célula huésped transformada o transfectada con un plásmido o sistema de vector como se describe en cualquiera de los párrafos 4 a 6.

- 45 8. Una célula huésped como se describe en el párrafo 7, en la que dicha célula huésped se deriva de un microorganismo que incluye bacterias tales como *B. subtilis*, *E. coli* y hongos, que incluyen levadura tal como *H. polymorpha*, *S. pombe*, *S. cerevisiae*.

9. Una célula huésped como se describe en el párrafo 8, en la que dicho microorganismo es una célula bacteriana procarionta y preferentemente *E. coli*.

- 50 10. Un procedimiento de producción de una fitasa que comprende expresar una secuencia de aminoácidos como se explica en SEC ID N°: 3, o una secuencia que tiene al menos el 90% de homología con la misma, en una célula

huésped y separar la fitasa del medio de cultivo de células huésped, en el que dichas secuencias de aminoácidos comprenden una mutación seleccionada del grupo explicado en el párrafo 1 o una combinación de mutaciones seleccionada del grupo explicado en el párrafo 1 y en el que la fitasa tiene elevada termoestabilidad en comparación con un polipéptido que tiene la secuencia explicada en SEC ID N° 3.

- 5 11. Una composición de alimento o de pienso animal que comprende un polipéptido como se define en el párrafo 1.
12. Uso de un polipéptido o fitasa como se describe en el párrafo 11 en alimento o pienso animal.
13. Un procedimiento para la producción de alimento o pienso animal que comprende una etapa de pulverizar un polipéptido o fitasa como se describe en el párrafo 11 en forma líquida sobre dicho alimento o pienso animal, y/o que comprende una etapa de mezclar el polipéptido o fitasa como se describe en el párrafo 11 como producto seco con dicho alimento o pienso animal.
- 10 14. Un procedimiento de cribado de una variante de enzima fitasa, procedimiento que comprende:
- a) seleccionar una enzima fitasa parental, en el que la enzima fitasa parental es una enzima fitasa parental con al menos el 90% de homología con SEC ID N° 3;
- 15 b) hacer al menos un alteración en la enzima fitasa parental para obtener una variante de enzima fitasa según el párrafo 1; y
- c) cribar una variante de enzima fitasa que en comparación con la enzima fitasa parental tiene mayor estabilidad térmica y:
- i. mayor actividad específica; y/o
- ii. mayor estabilidad proteolítica.
- 20 15. Un procedimiento de cribado de una variante de enzima fitasa, procedimiento que comprende:
- a) someter la secuencia de ADN que codifica una enzima fitasa parental a mutagénesis para obtener una variante de enzima fitasa según el párrafo 1, en el que la enzima fitasa parental es una enzima fitasa parental con al menos el 90% de homología con SEC ID N° 3;
- b) expresar la secuencia de ADN mutada obtenida en la etapa a) en una célula huésped; y
- 25 c) cribar células huésped que expresan una variante de enzima fitasa que en comparación con la enzima fitasa parental tienen mayor estabilidad térmica y:
- i. mayor actividad específica; y/o
- ii. mayor estabilidad proteolítica.
16. Un procedimiento de preparación de una variante de enzima fitasa, procedimiento que comprende:
- 30 a) seleccionar una enzima fitasa parental, en el que la enzima fitasa parental es una enzima fitasa parental con al menos el 90% de homología con SEC ID N° 3;
- b) hacer al menos una alteración en la enzima fitasa parental para obtener una variante de enzima fitasa según el párrafo 1; y
- c) preparar la variante de enzima fitasa.
- 35 17. Un procedimiento de preparación de una variante de enzima fitasa, procedimiento que comprende:
- a) someter la secuencia de ADN que codifica una enzima fitasa parental a mutagénesis para obtener una variante de enzima fitasa según el párrafo 1, en el que la enzima fitasa parental es una enzima fitasa parental con al menos el 90% de homología con SEC ID N° 3;
- b) expresar la secuencia de ADN mutada obtenida en la etapa a) en una célula huésped; y
- 40 c) preparar la variante de enzima fitasa expresada por la célula huésped.

El término “fitasa” significa una proteína o polipéptido que puede catalizar la hidrólisis de ésteres de ácido fosfórico que incluyen fitato y liberar fosfato inorgánico. Las fitasas pueden hidrolizar, además de fitato, al menos algunos de los fosfatos de inositol de grados intermedios de fosforilación.

El término “correspondiente a fitasa de *Citrobacter freundii*” significa que la enzima no necesita haber sido obtenida

de una fuente de *Citrobacter freundii*. En su lugar, la enzima tiene que tener esencialmente las mismas características funcionales o secuencia que las de la fitasa de *Citrobacter freundii*.

5 El término "equivalente funcional de la misma" significa que la enzima tiene que tener esencialmente las mismas características funcionales que la fitasa de *Citrobacter freundii* natural. El término "forma modificada" o "variante" significa que la enzima ha sido modificada de su forma original, pero retiene esencialmente las mismas características funcionales enzimáticas que la fitasa de *Citrobacter freundii* natural. En particular, los términos "variante" o "forma modificada" engloban enzimas de fitasa con una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de la fitasa parental/natural y que tienen una o más sustituciones de aminoácidos, inserciones y/o deleciones, que juntas se denominan mutaciones. Las formas modificadas o variantes pueden alterarse en las características de la enzima con respecto a la enzima parental. Preferentemente, las formas modificadas o variantes tienen una elevada termoestabilidad, una elevada estabilidad de pepsina, una elevada actividad específica, una especificidad de sustrato más ancha, u otras modificaciones que son beneficiosas para la aplicación de la enzima. El término fragmento "funcional" o "eficaz" significa un fragmento o porción de la fitasa de *Citrobacter freundii* que retiene esencialmente la misma función o efecto enzimático.

15 Preferentemente, la enzima de este aspecto de la presente invención tiene la misma secuencia o una secuencia que es al menos el 90% idéntica (homóloga) a la de la fitasa de *Citrobacter freundii*.

Adecuadamente, la enzima comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEC ID N°: 3 o una secuencia que tiene al menos el 90% de identidad (homología) con la misma o un fragmento funcional de la misma. En una realización preferida, la invención proporciona un polipéptido aislado y/o purificado que tiene la secuencia de aminoácidos que se explica en SEC ID N°: 3 o una secuencia que tiene al menos el 90% de identidad (homología) con la misma. En otra realización, la fitasa se caracteriza porque se deriva de la cepa P3-42 de *Citrobacter freundii* depositada bajo el número de acceso NCIMB 41247.

25 En una realización preferida, la descripción se refiere a una fitasa según cualquier realización del primer aspecto de la invención que comprende una o más mutaciones en las siguientes posiciones (numeración según la numeración en SEC ID N°: 3): 22, 23, 24, 28, 46, 53, 57, 67, 74, 75, 77, 78, 79, 82, 88, 95, 96, 97, 98, 101, 102, 103, 105, 109, 112, 122, 126, 136, 140, 142, 143, 148, 151, 152, 154, 156, 160, 161, 164, 168, 170, 176, 177, 195, 199, 203, 204, 205, 206, 207, 215, 224, 225, 229, 233, 235, 274, 279, 288, 301, 307, 308, 322, 343, 358, 360, 362, 365, 366, 367, 370, 383, 384, 385, 386, 391, 393, 395, 397, 408 y 414.

30 Estas posiciones se caracterizan porque la mutagénesis de la enzima en estas posiciones conduce a una mejora en las características de enzima deseadas.

Mutaciones preferidas descritas en el presente documento incluyen:

35 A22T, E23K, E23Q, E24D, M28L, K46E, K46R, D53K, D53N, D57Y, G67R, G74R, E75K, E75V, V77I, S78T, E79V, Q82H, Q82K, Q82R, F88Y, N95D, N95P, N96P, N96S, N96Y, Q97T, T98G, T98P, S101F, P102L, G103E, V105I, A109T, D112V, D112Y, F122Y, L126I, Y136N, E140V, K142R, T143I, T143P, N148D, K151G, M152K, M152V, T154I, S156T, L160F, K161N, N164D, E168D, A170T, L176Q, L176V, Y177F, S195T, T199I, T203I, T203L, T203S, T203W, E204A, E204G, E204H, E204I, E204N, E204R, E204V, K205P, K205R, S206R, S206T, T207A, T207S, L215F, D224H, N225D, N225B, P229S, S233C, S235A, Q274H, Q274L, Q279E, R288M, L301S, E307Y, N308D, N308T, A322V, G343A, K358R, K360N, T362A, T362I, N365D, T366S, D367N, Q370H, D383V, I384F, I384L, I384M, Q385R, P386Q, K391N, A393P, K395T, D397N, S408I y L414I o mutaciones conservativas en cada posición.

40 Por "mutaciones conservativas" se indica mutaciones a residuos de aminoácidos que son conservativos en términos de las características de aminoácidos con respecto al residuo de aminoácido indicado. Las características de aminoácidos incluyen el tamaño del residuo, hidrofobia, polaridad, carga, valor de pK, y otras características de aminoácidos conocidas en la técnica y también descritas más abajo en más detalle.

45 En una realización particularmente preferida de la descripción, las mutaciones son en una o más de las siguientes posiciones:

23, 46, 53, 75, 82, 88, 95, 96, 98, 112, 143, 152, 176, 177, 199, 203, 204, 205, 225, 229, 233, 274, 288, 307, 308, 362, 370, 384 y 385

Mutaciones preferidas en estas posiciones específicas incluyen:

50 E23K, E23Q, K46E, K46R, D53K, D53N, E75K, E75V, Q82H, Q82K, Q82R, F88Y, N95D, N95P, N96P, N96S, N96Y, T98G, D112V, D112Y, T143I, T143P, M152K, M152V, L176Q, L176V, Y177F, T199I, T203I, T203L, T203S, T203W, E204A, E204G, E204H, E204I, E204N, E204R, E204V, K205P, K205R, N225D, N225E, P229S, S233C, Q274H, Q274L, R288M, E307Y, N308D, N308T, T362A, T362I, Q370H, I384F, I384L, I384M y Q385R o mutaciones conservativas en cada posición.

En una realización de la descripción se proporciona una fitasa que comprende una mutación seleccionada del grupo

## ES 2 394 908 T3

que consiste en:

P229S; D112V; Q82R; Q274H; D112Y; F88Y; K46B; S233C; R288M; I384L; Q385R; Q274L; E307Y; T199I; Q82K y T203I.

5 En otra realización preferida de la descripción se proporciona una fitasa que comprende una combinación de mutaciones seleccionada del grupo que consiste en:

10 K46E/Q82H; Q82K/V105I; N148D/T362I; K46E/L414I; F88Y/Y136N; T154I/P386Q; N95P/N96S; N95P/N96P; Q97T/T98G; D224H/N225E; Y177F/T199I; Q274L/Q370H; K46E/N96Y; N148D/L301S; E24D/R288M; E140V/A322V; K46E/S195T; E75K/N365D; T98P/S235A; L160F/L215F; Q274L/K395T; G67R/Q279R/N308T; K161N/P229S/R288M; D53N/D57Y/M152V; F122Y/S156T/P229S; T199I/S206R/T207S; E23K/K46E/Q82H; K46E/Q82H/Q385R; T203W/E204N/K205R; T203W/E204H/K205R; T203W/E204R/K205R; T203W/E204A/K205R; A22T/K151G/N308D; E23K/E75K/F88Y; M152K/N225D/L301S; S78T/Q274L/S408I; L176Q/T199I/T366S; K46E/V77I/T203S; K46R/T199I/D367N; G74R/E204G/R288M; A22T/T199I/S206T/T207A; Q82R/F88Y/L126I/I384L; K46E/Q82H/E168D/Q274L; Q82K/T154I/Q279E/N308T; Q82R/D112V/Q274H/T362A; E24D/E79V/N95D/K360N; E23K/M28L/A109T/T143P/I384L; D53N/D57Y/T199I/P229S/R288M; K46E/Q82H/N148D/T154I/T362I; 15 D53N/D57Y/P229S/R288M/K358R; D53N/D57Y/T154I/P229S/R288M; Y136N/T199I/T203L/E204I/K205P; E23Q/S101F/Q274L/I384M/K391N; K46E/Q82H/N95D/D112V/K142R/D383V; D53N/D57Y/M152V/P229S/R288M/A393P; D53K/D57Y/M152V/P229S/R288M/A393P; D53N/D57Y/F88Y/M152V/P229S/Q279E/N308T; D53N/D57Y/M152V/E204V/P229S/R288M/A393P; D53N/D57Y/M152V/T154I/P229S/R288M/A393P; D53N/D57Y/Q82H/G103E/M152V/P229S/R288M/A393P; 20 K46E/D53N/D57Y/T143I/M152V/L176V/P229S/R288M/A393P; Q82K/F88Y/N96P/Q97T/T98G/V105I/Q274H/Q279E/A393P; Q82R/F88Y/N95P/N96P/Q97T/Q279E/I384L/P386Q/A393P; H18Q/D53N/D57Y/E75V/M152V/A170T/P229S/R288M/Q385R/A393P; Q82K/F88Y/N96P/T98G/Y136N/M152V/Y177F/T362I/I384F/A393P/D397N;

25 D53N/D57Y/F88Y/N95P/N96P/V105I/D112V/Y136N/N148D/N164D/Q274H/T362I/I384L/A393P;

D53N/D57Y/Q82K/F88Y/N95P/P102L/V105I/Y136N/N148D/Y177F/Q274H/Q279E/T362I/A393P y

D53N/D57Y/Q82K/F88Y/N96P/T98G/V105I/D112V/Y177F/Q274L/G343A/T362I/I384L/A393P.

En todavía otra realización preferida de la descripción se proporciona una fitasa que comprende una combinación de mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en:

30 D57Y/F88Y/N95P/Q97T/N148D/M152V/T154I/Y177F/Q274H/I384L; D53N/D57Y/F88Y/N95P/N96P/Q97T/M152V/Y177F/Q274H/Q279E/T362I/I384L; D53N/Q82K/F88Y/N96P/T98G/V105I/N148D/T154I/Q274H/T362I/I384L/P386Q; Q82R/F88Y/N96P/T98G/V105I/D112V/Y136N/V148D/T154I/Y177F/P386Q/A393P D53N/Q82K/F88Y/N95P/N96P/T98G/Y136N/N148D/T154I/I384L/P386Q/A393P; 35 D57Y/Q82K/F88Y/N96P/Q97T/T98G/V105I/N148D/T154I/Y177F/Q274H/I384L/P 386Q/A393P;

D53N/Q82K/F88Y/N95P/Q97T/T98G/D112V/Y136N/N148D/T154I/Q274H/Q279E/ I384L/P386Q/A393P

y

D53N/D57Y/Q82R/F88Y/N95P/N96P/Q97T/T98G/V105I/Y136N/N148D/M152V/Y 177F/I384L/P386Q.

40 Por consiguiente, una fitasa preferida según la presente descripción es una variante que consiste en la secuencia de aminoácidos enumerada como SEC ID N°: 3 y que tiene una o más de las mutaciones de aminoácidos enumeradas anteriormente o una de las combinaciones de mutaciones enumeradas anteriormente.

En estas realizaciones, la nomenclatura indica una fitasa que comprende la secuencia de aminoácidos explicada en SEC ID N°: 3 con las mutaciones indicadas por referencia a las posiciones de los aminoácidos en SEC ID N°: 3. La nomenclatura se describe más abajo en más detalle.

45 Adecuadamente, estas variantes muestran características mejoradas con respecto a una cualquiera de las siguientes: estabilidad a la temperatura, intervalo de pH, estabilidad de pepsina, actividad específica, especificidad de sustrato. Procedimientos adecuados para determinar estas características se desvelan en el presente documento.

50 En particular, las mejoras en las características de la fitasa se refieren a la estabilidad de la enzima bajo condiciones de procesamiento de alimentos y piensos, a la estabilidad de la enzima durante el tránsito estomacal y a la actividad enzimática y estabilidad en el estómago y/o tubo intestinal humano o animal que hace que las variantes mejoradas sean particularmente adecuadas para su uso como suplementos para piensos. Por tanto, tales mejoras comprenden, entre otros parámetros, el aumento en la estabilidad a temperaturas elevadas, preferentemente a temperaturas

superiores a 65°C, el aumento en la estabilidad contra la digestión proteolítica, preferentemente proteasa del tubo digestivo, el aumento en la actividad catalítica a bajo pH, preferentemente la actividad catalítica por debajo de pH 5,5, y la eficiencia general de liberar grupos fosfato del fitato.

5 Adecuadamente, en una realización, la fitasa o equivalente funcional de la presente invención se caracteriza porque dicha fitasa tiene una actividad específica de 1000 U/mg o mayor en la que dicha actividad específica se determina incubando dicha fitasa en una disolución que contiene fitato 2 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,8 mM en tampón acetato sódico 200 mM a pH 3,5. En otra realización, la fitasa de la presente invención o equivalente funcional de la misma también puede caracterizarse adecuadamente porque dicha fitasa tiene dos máximos de actividad a aproximadamente pH 3 y pH 4 - 10 4,5 en la que dicha actividad se determina incubando dicha fitasa en una disolución que contiene fitato 2 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,8 mM en tampón acetato sódico 200 mM.

En otra realización, la descripción proporciona un procedimiento de preparación de una variante de enzima fitasa, procedimiento que comprende:

a) Seleccionar una enzima fitasa parental, en el que la enzima fitasa parental está seleccionada de

i. una enzima fitasa parental con al menos el 75% de homología con SEC ID N° 3

15 ii. una enzima fitasa parental derivada de *Citrobacter spp.*

b) Hacer al menos una alteración que es una inserción, una delección o una sustitución de un residuo de aminoácido en la enzima fitasa parental para obtener una variante de enzima fitasa

c) Cribar una variante de enzima fitasa que en comparación con la enzima fitasa parental tiene:

i. mayor estabilidad térmica y/o

20 ii. actividad específica y/o

iii. estabilidad proteolítica y/o

d) Preparar la variante de enzima fitasa

En otra realización la descripción proporciona un procedimiento de preparación de una variante de enzima fitasa, procedimiento que comprende:

25 a) Someter la secuencia de ADN que codifica una enzima fitasa parental a mutagénesis, en el que la enzima fitasa parental está seleccionada de

i. una enzima fitasa parental con al menos el 75% de homología con SEC ID N° 3

ii. una enzima fitasa parental derivada de *Citrobacter spp.*

b) Expresar la secuencia de ADN mutada obtenida en la etapa (A) en una célula huésped, y

30 c) Cribar células huésped que expresan una variante de enzima fitasa que en comparación con la enzima fitasa parental tiene:

iv. mayor estabilidad térmica y/o

v. mayor actividad específica\* y/o

vi. mayor estabilidad proteolítica y/o

35 Preparar la variante de enzima fitasa expresada por la célula huésped.

En las realizaciones anteriores de la descripción, que se refieren a procedimientos de preparación de variante de enzima fitasa, la variante de enzima fitasa se criba preferentemente para mayor estabilidad térmica.

40 En las realizaciones anteriores de la descripción, que se refieren a procedimientos de preparación de variante de enzima fitasa, la variante de enzima fitasa se criba preferentemente para mayor estabilidad térmica y mayor estabilidad proteolítica.

En las realizaciones anteriores de la descripción, que se refieren a procedimientos de preparación de variante de enzima fitasa, la variante de enzima fitasa se criba preferentemente para mayor estabilidad térmica y mayor estabilidad proteolítica y mayor actividad específica.

La enzima fitasa parental se deriva preferentemente de *Citrobacter freundii*, más preferentemente P3-42 de

*Citrobacter freundii*.

5 En procedimientos de preparación de una variante de enzima fitasa, procedimiento que comprende someter la secuencia de ADN que codifica una enzima fitasa parental a mutagénesis, la secuencia de ADN que codifica una enzima fitasa parental se somete preferentemente a mutagénesis al azar, más preferentemente PCR propensa a error, incluso más preferentemente PCR de umbral de error.

10 Los procedimientos preferidos de mutagénesis de la secuencia de ADN que codifica una enzima fitasa parental es PCR propensa a error, más preferentemente PCR de umbral de error, pueden usarse otros procedimientos de mutagénesis tanto en lugar de PCR propensa a/de umbral de error como conjuntamente con PCR propensa a/de umbral de error. Véase el Ejemplo 12 que proporciona referencias para procedimientos de PCR propensa a error y PCR de umbral de error adecuados. Otros procedimientos se desvelan bajo el

15 El término 'expresión en una célula huésped' cuando se usa en el contexto de las realizaciones que se refieren a 'un procedimiento de preparación de una variante de enzima fitasa' se define preferentemente como la producción de la variante de enzima fitasa en un organismo vivo, órgano o célula como se define en el presente documento. Sin embargo, se considera que con el fin de selección las variantes de enzima fitasa también pueden producirse por procedimientos *in vitro* que utilizan la maquinaria de transcripción y traducción aislada de una o más células aisladas de uno o más organismos vivos. Tal producción *in vitro* de variantes fitasa en la invención también puede usarse para seleccionar fitasas de variante preferidas. La expresión *in vitro* puede realizarse de forma adecuada usando técnicas convencionales. Para referencia véase, por favor, '*In vitro* Expression Guide' available from Promega Inc (Parte nº BR053).

20 Definiciones de fenotipos de variantes.

Las variantes con mayor estabilidad térmica (diferencia de estabilidad térmica) se determinan preferentemente usando los procedimientos desvelados en el Ejemplo 12.

25 La enzima fitasa de variante preparada mediante el procedimiento de preparación de las variantes de enzima fitasa tiene preferentemente una diferencia de estabilidad térmica de al menos 1,5, más preferentemente 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 5, 6, 7, 8, 9, lo más preferentemente al menos 10.

Variantes con mayor estabilidad proteolítica se determinan preferentemente por los procedimientos desvelados en el Ejemplo 12.

30 Preferentemente, la variante de enzima fitasa de la invención tiene una estabilidad proteolítica de al menos el 45%, preferentemente el 50%, 55%, más preferentemente al menos el 60%.

Otras realizaciones de variantes

En otra realización, la descripción proporciona procedimientos para la preparación de un pienso animal que comprende una variante de enzima fitasa.

a) Seleccionar una enzima fitasa parental, en los que la enzima fitasa parental está seleccionada de

- 35 i. una enzima fitasa parental con al menos el 75% de homología con SEC ID N° 3  
ii. una enzima fitasa parental derivada de *Citrobacter spp.*

b) Hacer al menos una alteración que es una inserción, una delección o una sustitución de un residuo de aminoácido en la enzima fitasa parental para obtener una variante de enzima fitasa

c) Cribar una variante de enzima fitasa que en comparación con la enzima fitasa parental tiene:

- 40 i. mayor estabilidad térmica y/o  
ii. actividad específica y/o  
iii. estabilidad proteolítica y/o

d) Preparar la variante de enzima fitasa

e) Añadir la variante de enzima fitasa preparada a un pienso animal.

45 En otra realización, la descripción proporciona procedimientos para la preparación de un pienso animal que comprende una variante de enzima fitasa.

a) Someter la secuencia de ADN que codifica una enzima fitasa parental a mutagénesis, en los que la

enzima fitasa parental está seleccionada de

iii. una enzima fitasa parental con al menos el 75% de homología con SEC ID N° 3

iv. una enzima fitasa parental derivada de *Citrobacter spp.*

b) Expresar la secuencia de ADN mutada obtenida en la etapa (A) en una célula huésped, y

5 c) Cribar células huésped que expresan una variante de enzima fitasa que en comparación con la enzima fitasa parental tiene:

vii. mayor estabilidad térmica y/o

viii. mayor actividad específica\* y/o

ix. mayor estabilidad proteolítica y/o

10 d) Preparar la variante de enzima fitasa expresada por la célula huésped

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

Los aspectos preferidos del procedimiento de preparación de una variante de enzima fitasa también se aplican a los procedimientos anteriores de preparación de un pienso animal que comprende una variante de enzima fitasa

15 En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico o secuencia de nucleótidos aislada y/o purificada que codifica la enzima que comprende la secuencia de aminoácidos correspondiente a fitasa de *Citrobacter freundii*, o un homólogo de la misma. Adecuadamente, dicha molécula de ácido nucleico aislada y/o purificada codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEC ID N°: 3 o una secuencia que tiene al menos el 90% de identidad (homología) con la misma. En una realización, la molécula de ácido nucleico codifica un polipéptido que comprende SEC ID N°:3 y que incluye mutaciones en las posiciones preferidas enumeradas en el presente documento o cualquiera de las mutaciones o combinaciones específicas de mutaciones enumeradas en el presente documento. También se describe en el presente documento una molécula de ácido nucleico aislada y/o purificada que comprende una secuencia de nucleótidos que es la misma que, o es complementaria a, o contiene cualquier sustitución de codón adecuada para cualquiera de aquellas de SEC ID N°: 2 o comprende una secuencia que tiene al menos el 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o el 99% de homología de secuencias con SEC ID N°: 2.

25 En todavía otro aspecto, en el presente documento se describe una secuencia de nucleótidos y el uso de una secuencia de nucleótidos mostrada como:

(a) la secuencia de nucleótidos presentada como SEC ID N° 2,

30 (b) una secuencia de nucleótidos que es una variante, homólogo, derivado o fragmento de la secuencia de nucleótidos presentada como SEC ID N° 2;

(c) una secuencia de nucleótidos que es el complemento de la secuencia de nucleótidos explicada en SEC ID N° 2;

(d) una secuencia de nucleótidos que es el complemento de una variante, homólogo, derivado o fragmento de la secuencia de nucleótidos presentada como SEC ID N° 2;

35 (e) una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse con la secuencia de nucleótidos explicada en SEC ID N° 2;

(f) una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse con una variante, homólogo, derivado o fragmento de la secuencia de nucleótidos presentada como SEC ID N° 2;

40 (g) una secuencia de nucleótidos que es el complemento de una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse con la secuencia de nucleótidos explicada en SEC ID N° 2;

(h) una secuencia de nucleótidos que es el complemento de una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse con una variante, homólogo, derivado o fragmento de la secuencia de nucleótidos presentada como SEC ID N° 2;

45 (i) una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse con el complemento de la secuencia de nucleótidos explicada en SEC ID N° 2;

(j) una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse con el complemento de una variante, homólogo,

derivado o fragmento de la secuencia de nucleótidos presentada como SEC ID N°. 2.

La secuencia de nucleótidos de la presente invención puede comprender secuencias que codifican SEC ID N°. 3.

En particular, la invención proporciona un plásmido o sistema de vector que comprende una fitasa como se describe en el presente documento. Preferentemente, el plásmido o sistema de vector comprende una secuencia de ácidos nucleicos como se explica en SEC ID N°: 2 o una secuencia que es al menos el 75% homóloga a la misma. Adecuadamente, el plásmido o sistema de vector es un vector de expresión para la expresión de cualquiera de las enzimas codificadas por una secuencia de ácidos nucleicos como se explica en cualquiera de SEC ID N°: 2 o una secuencia que es al menos el 75% homóloga (idéntica) a la misma en un microorganismo. Además, la invención proporciona un plásmido o sistema de vector para la expresión de cualquiera de las enzimas o variantes modificadas descritas en el presente documento. Vectores de expresión adecuados se describen en el presente documento.

En otro aspecto de la invención se proporciona una célula huésped transformada o transfectada con un ácido nucleico que codifica una fitasa como se describe en el presente documento.

Adecuadamente, la célula huésped según este aspecto de la invención comprende una fitasa que comprende una secuencia de aminoácidos como se explica en SEC ID N°: 3 o una secuencia que es al menos el 90% homóloga a la misma.

En una realización preferida, dicha célula huésped produce una fitasa.

En otro aspecto de la invención se proporciona una célula huésped transformada o transfectada con un ácido nucleico que codifica una fitasa según la invención. Preferentemente, la fitasa es una fitasa de *Citrobacter freundii* como se describe en el presente documento o un homólogo o derivado de la misma. Adecuadamente, dicha enzima fitasa comprende una secuencia de aminoácidos como se explica en cualquiera de SEC ID N°: 3 o una secuencia que es al menos el 90% homóloga (idéntica) a la misma. Preferentemente, dicha célula huésped produce una fitasa.

En una realización, la secuencia de nucleótidos que puede usarse en la presente invención es obtenible de (aunque es realidad no tiene que ser obtenida de) *Citrobacter freundii*, aunque se reconocerá que las enzimas aisladas y/o purificadas de cepas equivalentes pueden usarse igualmente.

Adecuadamente, la célula huésped se deriva de un microorganismo que incluye bacterias y hongos, que incluyen levadura. En una realización particularmente preferida, la célula huésped es una célula bacteriana procariota. Células huésped bacterianas adecuadas incluyen bacterias de diferentes grupos taxonómicos procariotas que incluyen proteobacterias, que incluyen miembros de la subdivisión alfa, beta, gamma, delta y epsilon, bacterias Gram-positivas tales como *Actinomycetes*, *Firmicutes*, *Clostridium* y familiares, flavobacterias, cianobacterias, bacterias verdes del azufre, bacterias verdes no del azufre y arqueas. Particularmente se prefieren las *Enterobacteriaceae* tales como las proteobacterias de *Escherichia coli* que pertenecen a la subdivisión gamma y bacterias Gram-positivas con bajo GC tales como *Bacillus*.

Células huésped fúngicas adecuadas incluyen levadura seleccionada del grupo que consiste en *Ascomycota* que incluye *Saccharomycetes* tales como *Pichia*, *Hansenula* y *Saccharomyces*, *Schizosaccharomycetes* tales como *Schizosaccharomyces pombe* y *Ascomycota* anamórficas que incluyen *Aspergillus*.

Otras células huésped eucariotas adecuadas incluyen células de insecto tales como células SF9, SF21, de *Trichoplusia ni* y M121. Por ejemplo, los polipéptidos según la invención pueden expresarse ventajosamente en sistemas de células de insecto. Además de la expresión en células de insecto en cultivo, los genes de fitasa pueden expresarse en organismos de insecto completos. Vectores de virus tales como baculovirus permiten la infección de insectos enteros. Insectos mayores, tales como polillas de la seda, proporcionan un alto rendimiento de proteína heteróloga. La proteína puede extraerse de los insectos según técnicas de extracción convencionales. Vectores de expresión adecuados para su uso en la invención incluyen todos los vectores que pueden expresar proteínas extrañas en líneas celulares de insecto.

Otras células huésped incluyen células vegetales seleccionadas del grupo que consiste en protoplastos, células, callos, tejidos, órganos, semillas, embriones, óvulos, cigotos, etc. La invención también proporciona plantas enteras que han sido transformadas y comprenden el ADN recombinante de la invención.

El término "planta" generalmente incluye alga eucariota, embriofitos que incluyen *Bryophyta*, *Pteridophyta* y *Spermatophyta* tales como gimnospermas y angiospermas.

Preferentemente, dicha célula huésped es un microorganismo. Microorganismos preferidos incluyen células bacterianas procariotas, preferentemente *E. coli*, *B. subtilis* y otras especies del género *Bacillus*, levadura, preferentemente *Hansenula polymorpha* y *Schizosaccharomyces pombe*.

En el presente documento también se proporciona una cepa de célula bacteriana P3-42 de *Citrobacter freundii* depositada por Danisco Global Innovation, Sokeritehtaantie 20, FIN-02460 Kantvik, Finlandia, bajo el número de

acceso NCIMB 41247. Una célula tal puede incorporarse directamente en el pienso.

En otro aspecto se proporciona un procedimiento para la producción de fitasas que comprende transfectar una célula huésped con un vector de expresión o plásmido según la invención, cultivar dicha célula huésped en condiciones para la expresión de la fitasa y extraer dicha fitasa del medio de cultivo de células huésped.

- 5 Adecuadamente, dicho procedimiento es para la producción de una fitasa que comprende expresar una secuencia de aminoácidos como se explica en SEC ID N°: 3 o una secuencia que tiene al menos el 90% de homología con la misma o un fragmento eficaz de la misma en una célula huésped y extraer la proteína secretada del medio de cultivo de células huésped.

- 10 Otro aspecto de la invención proporciona una composición de pienso que comprende una fitasa según la invención. Preferentemente, la composición de pienso comprende una fitasa a una concentración de 10-10000 U/kg de pienso, preferentemente, 200-2000U/kg de pienso, más preferentemente, 500-1000 U/kg de pienso.

En una realización, la composición de pienso comprende una célula huésped según la invención.

En otro aspecto se proporciona el uso de una fitasa según la invención en alimento o pienso animal.

#### **ASPECTOS PREFERIBLES**

- 15 Aspectos preferibles se presentan en las reivindicaciones adjuntas y en la siguiente descripción y sección de ejemplos.

#### **VENTAJAS ADICIONALES**

La presente invención es ventajosa, ya que proporciona fitasas que tienen varias propiedades que las hacen particularmente útiles como aditivos para piensos animales.

- 20 En particular, las fitasas de la presente invención son activas a bajo pH y, preferentemente en el intervalo de pH 2 a 5,5 con actividad máxima a aproximadamente pH 3 y 4,5. Adecuadamente, las fitasas de la presente invención son activas a bajos pH del entorno del estómago.

Además, las fitasas de la presente invención son eficientemente secretadas tanto en el huésped nativo como durante la expresión heteróloga, conduciendo así a producción y aislamiento más eficiente para la adición a pienso.

- 25 Además, las fitasas de la presente invención tienen una amplia especificidad de sustrato que incluye sustratos de penta-, tetra-, tri- y di-fosfato, aumentando así el fosfato disponible total para el animal. Las fitasas de la presente invención también tienen una alta actividad específica en la región de 1000 U/mg +/- aproximadamente 10%.

Los productos de la presente invención pueden usarse como aditivos/suplementos a alimentos y pienso. Los productos también pueden ser útiles en la producción comercial de diversos fosfatos de inositol.

- 30 **FITATO/ÁCIDO FÍTICO/FITASAS**

El ácido fítico (hexaquisfosfato de *mio*-inositol) es un constituyente importante en cereales, legumbres y cultivos de oleaginosas. La forma de sal, el fitato, es la principal forma de almacenamiento de fósforo en estas plantas.

Las fitasas catalizan la hidrólisis de los monoésteres de fosfato del ácido fítico que produce la formación escalonada de pentaquis-, tetraquis-, tris-, bis- y monofosfatos de *mio*-inositol, además de la liberación de fosfato inorgánico.

- 35 Los términos "fitasa natural" o "natural" como se usa en el presente documento se refieren a una enzima fitasa con una secuencia de aminoácidos encontrada en la naturaleza.

Los términos "variante de fitasa" o "variante" o "forma modificada" se refieren a una enzima fitasa con una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de una fitasa parental que tiene una o más sustituciones de aminoácidos, inserciones y/o deleciones, que juntas se denominan "mutaciones".

- 40 Los términos "fitasa parental" o "enzima parental" se refieren a una enzima fitasa de la que se deriva una variante de fitasa. Una fitasa parental puede ser una fitasa natural u otra variante de fitasa. En particular, en la presente invención, una "fitasa parental" puede derivarse de *Citrobacter freundii*. Adecuadamente, la "fitasa parental" se deriva de la cepa P3-42 de *Citrobacter freundii* como se describe en el presente documento que tiene preferentemente la secuencia de aminoácidos explicada en SEC ID N°:3.

- 45 **AISLADA**

En un aspecto, preferentemente la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos está en una forma aislada. El término "aislada" significa que la secuencia está al menos sustancialmente libre de al menos otro componente con el que la

secuencia está naturalmente asociado en la naturaleza y se encuentra en la naturaleza.

#### **PURIFICADA**

5 En un aspecto, preferentemente la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos está en una forma purificada. El término "purificada" significa que la secuencia está en un estado relativamente puro, por ejemplo, al menos aproximadamente el 90% de pureza, o al menos aproximadamente el 95% de pureza o al menos aproximadamente el 98% de pureza.

#### **SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS**

El alcance de la presente invención engloba secuencias de nucleótidos que codifican enzimas que tienen las propiedades específicas como se definen en el presente documento.

10 El término "secuencia de nucleótidos" como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia de oligonucleótidos, secuencia de ácidos nucleicos o polinucleótidos, y variantes, homólogos, fragmentos y derivados de las mismas (tal como porciones de las mismas). La secuencia de nucleótidos puede ser de origen genómico o sintético o recombinante, que puede ser bicatenaria o monocatenaria si representa la cadena codificante o no codificante.

15 El término "secuencia de nucleótidos" 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.

20 En una realización preferida, la secuencia de nucleótidos cuando se refiere a y cuando está englobada por el alcance por sí mismo de la presente invención no incluye la secuencia de nucleótidos nativa según la presente invención cuando está en su entorno natural y cuando está ligada a su(s) secuencia(s) naturalmente asociada(s) que también está/n en su entorno natural. Para facilidad de referencia, los inventores llaman a esta realización preferida la "secuencia de nucleótidos no nativa". A este respecto, el término "secuencia de nucleótidos nativa" significa una secuencia de nucleótidos entera que está en su entorno nativo y cuando está operativamente ligada a un promotor entero con el que está naturalmente asociado, promotor que también está en su entorno nativo. Sin embargo, la secuencia de aminoácidos englobada por el alcance de la presente invención puede aislarse y/o purificarse después de la expresión de una secuencia de nucleótidos en su organismo nativo. Preferentemente, sin embargo, la secuencia de aminoácidos englobada por el alcance de la presente invención puede expresarse por una secuencia de nucleótidos en su organismo nativo, pero en el que la secuencia de nucleótidos no está bajo el control del promotor con el que está naturalmente asociado dentro de ese organismo.

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

30 Normalmente, la secuencia de nucleótidos englobada por el alcance de la presente invención o las secuencias de nucleótidos para su uso en la presente invención se preparan usando técnicas de ADN recombinante (es decir, ADN recombinante). Sin embargo, en una realización alternativa de la invención, la secuencia de nucleótidos podría sintetizarse, en su conjunto o en parte, usando procedimientos químicos muy conocidos en la técnica (véanse Caruthers MH y col., (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 215-23 y Hom T y col., (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 225-232).

40 Una secuencia de nucleótidos que codifica tanto una enzima que tiene las propiedades específicas como se definen en el presente documento como una enzima que es adecuada para modificación puede identificarse y/o aislarse y/o purificarse a partir de cualquier célula u organismo que produzca dicha enzima. Diversos procedimientos son muy conocidos dentro de la materia para la identificación y/o aislamiento y/o purificación de secuencias de nucleótidos. A modo de ejemplo, la amplificación por técnicas de PCR para preparar más de una secuencia puede usarse una vez se ha identificado y/o aislado y/o purificado una secuencia adecuada.

45 A modo de otro ejemplo, un ADN genómico y/o biblioteca de ADNc puede construirse usando 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, pueden sintetizarse sondas de oligonucleótidos marcadas y usarse para identificar clones que codifican enzima de la biblioteca genómica preparada a partir del organismo. Alternativamente, una sonda de oligonucleótidos marcada que contiene secuencias homólogas a otro gen de enzima conocido podría usarse para identificar clones que codifican enzimas. En el último caso se usan condiciones de hibridación y de lavado de menor rigurosidad.

50 Alternativamente, los clones que codifican enzima podrían identificarse insertando fragmentos de ADN genómico en un vector de expresión, tal como un plásmido, transformando bacterias negativas para enzima con la biblioteca de ADN genómico resultante y luego sembrando las bacterias transformadas sobre placas de agar que contienen un sustrato para la enzima (por ejemplo, maltosa para una enzima productora de glucosidasa (maltasa)), permitiendo así que los clones expresen la enzima que va a identificarse.

En todavía otra alternativa, la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima puede prepararse sintéticamente por procedimientos convencionales establecidos, por ejemplo, el procedimiento de fosforamido descrito por Beucage S.L. y col., (1981) Tetrahedron Letters 22, p 1859-1869, o el procedimiento descrito por Matthes y col., (1984) EMBO J. 3, p 801-805. En el procedimiento de fosforamido, los oligonucleótidos se sintetizan, por ejemplo, en un sintetizador de ADN automático, se purifican, se hibridan, se ligan y se clonan en vectores apropiados.

La secuencia de nucleótidos puede ser de origen genómico y sintético mixto, origen sintético y de ADNc mixto, u origen genómico y de ADNc mixto, preparada ligando los fragmentos de origen sintético, genómico o de ADNc (según sea apropiado) según técnicas convencionales. Cada fragmento ligado se corresponde con diversas partes de la secuencia de nucleótidos entera. La secuencia de ADN también puede prepararse por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores específicos, por ejemplo, como se describen en el documento US 4.683.202 o en Saiki R K y col., (Science (1988) 239, pág. 487-491).

Debido a la degeneración en el código genético, pueden producirse fácilmente secuencias de nucleótidos en las que el uso de codones en triplete, para algunos o todos los aminoácidos codificados por la secuencia de nucleótidos original, ha sido cambiado, produciendo así una secuencia de nucleótidos con baja homología con 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 es en la tercera posición en el codón en triplete (posición de titubeo) (para referencia véase Stryer, Lubert, Biochemistry, tercera edición, Freeman Press, ISBN 0-7167-1920-7), por tanto, una secuencia de nucleótidos en la que todos los codones en triplete han sido "titubeados" en la tercera posición sería aproximadamente el 66% idéntica a la secuencia de nucleótidos original; sin embargo, la secuencia de nucleótidos corregida codificaría la misma secuencia de aminoácidos primaria, o una variante, que la secuencia de nucleótidos original.

Por tanto, la presente invención se refiere además a cualquier secuencia de nucleótidos que tenga uso de codones en triplete alternativo para al menos un aminoácido que codifica codón en triplete, pero que codifica la misma secuencia de polipéptidos, o una variante, que la secuencia de polipéptidos codificada por la secuencia de nucleótidos original.

Además, organismos específicos normalmente tienen un sesgo en cuanto a que los codones en triplete se usan para codificar aminoácidos. Las tablas de uso de codones preferidas están ampliamente disponibles y pueden usarse para preparar genes optimizados por codones. Tales técnicas de optimización de codones se usan rutinariamente para optimizar la expresión de transgenes en un huésped heterólogo.

## **EVOLUCIÓN MOLECULAR**

Una vez que una secuencia de nucleótidos que codifica enzima ha sido aislada y/o purificada, o se ha identificado una secuencia de nucleótidos putativa que codifica enzima, puede desearse modificar la secuencia de nucleótidos deseada, por ejemplo, puede desearse mutar la secuencia con el fin de preparar una enzima que tenga características de estabilidad mejoradas según la presente invención.

Las mutaciones pueden introducirse usando oligonucleótidos sintéticos. Estos oligonucleótidos contienen secuencias de nucleótidos que flanquean los sitios de mutación deseados.

Un procedimiento adecuado se desvela en Morinaga y col. (Biotechnology (1984) 2, p646-649). Otro procedimiento de introducir mutaciones en secuencias de nucleótidos que codifican enzima se describe en Nelson y Long (Analytical Biochemistry (1989), 180, p 147-151).

En lugar de mutagénesis dirigida a sitio, tal como se ha descrito anteriormente, pueden introducirse mutaciones al azar, por ejemplo, usando un kit comercial tal como el kit de mutagénesis por PCR GeneMorph de Stratagene, o el kit de mutagénesis al azar por PCR Diversify de Clontech.

Un tercer procedimiento para obtener secuencias novedosas es fragmentar secuencias de nucleótidos no idénticas, usando tanto cualquier número de enzimas de restricción como una enzima tal como ADNsa I, y reensamblando secuencias de nucleótidos completas que codifican proteínas funcionales. Alternativamente puede usarse una o múltiples secuencias de nucleótidos no idénticas e introducir mutaciones durante el reensamblaje de las secuencia de nucleótidos completas.

Por tanto, es posible producir numerosas mutaciones dirigidas a sitio o al azar en una secuencia de nucleótidos, tanto *in vivo* como *in vitro*, y posteriormente cribar la funcionalidad mejorada del polipéptido codificado por diversos medios.

Como ejemplo no limitante, mutaciones o variantes naturales de una secuencia de polinucleótidos pueden recombinarse con tanto mutaciones naturales u otras mutaciones como variantes naturales para producir nuevas variantes. Tales nuevas variantes también pueden cribarse para mejorar la funcionalidad del polipéptido codificado. La producción de nuevas variantes preferidas pueden lograrse por diversos procedimientos bien establecidos en la materia, por ejemplo, la mutagénesis de umbral de error (documento WO 92/18645), mutagénesis al azar mediada

por oligonucleótidos (documento US 5.723.323), barajado de ADN (documento US 5.605.793), ensamblaje de genes mediado por exo (documento WO 0058517) o reacción en cadena por recombinación RCR® (documentos EP 1230390 y US 6.821.758). Otros procedimientos adecuados se describen, por ejemplo, en los documentos WO 0134835, WO 02/097130, WO 03/012100, WO03/057247, WO 2004/018674, US 6.303.344 y US 6.132.970.

- 5 La aplicación de los procedimientos de evolución molecular anteriormente mencionados y similares permite la identificación y selección de variantes de las enzimas de la presente invención que tienen características preferidas sin ningún conocimiento previo de la estructura o función de proteínas, y permite la producción de mutaciones o variantes no predecibles, pero beneficiosas. Hay numerosos ejemplos de la aplicación de evolución molecular en la materia para la optimización o alteración de la actividad enzimática, tales ejemplos incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: expresión y/o actividad optimizada en una célula huésped o *in vitro*, actividad enzimática elevada, especificidad de sustrato y/o de producto alterada, aumento o disminución de la estabilidad enzimática o estructural, actividad enzimática/especificidad alterada en condiciones medioambientales preferidas, por ejemplo, temperatura, pH, sustrato

### SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS

- 15 El alcance de la presente invención también engloba secuencias de aminoácidos de enzimas que tienen las propiedades específicas que se definen en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término "secuencia de aminoácidos" es sinónimo del término "polipéptido" y/o el término "proteína". En algunos casos, el término "secuencia de aminoácidos" es sinónimo del término "péptido". En algunos casos, el término "secuencia de aminoácidos" es sinónimo del término "enzima".

- 20 La secuencia de aminoácidos puede prepararse/aislarse a partir de una fuente adecuada, o puede prepararse sintéticamente o puede prepararse usando técnicas de ADN recombinante.

- La enzima englobada en la presente invención puede usarse conjuntamente con otras enzimas. Por tanto, en el presente documento también se describe una combinación de enzimas en la que la combinación comprende la enzima de la presente invención y otra enzima, que puede ser otra enzima según la presente invención. Este aspecto se trata en una sección después.

Preferentemente, la secuencia de aminoácidos cuando se refiere a y cuando está englobada por el alcance por sí mismo de la presente invención no es una enzima nativa. A este respecto, el término "enzima nativa" significa una enzima entera que están en su entorno nativo y cuando ha sido expresada por su secuencia de nucleótidos nativa.

### VARIANTES/HOMÓLOGOS/DERIVADOS

- 30 La presente invención también engloba el uso de variantes, homólogos y derivados de cualquier secuencia de aminoácidos de una enzima o de cualquier secuencia de nucleótidos que codifica una enzima tal.

- Aquí, el término "homólogo" significa una entidad que tiene una cierta homología con las secuencias de aminoácidos y las secuencias de nucleótidos. Aquí, el término "homología" puede equipararse a "identidad". Adecuadamente, "homólogo" en este contexto se refiere al porcentaje de identidad de secuencias entre dos enzimas después de alinearse sus secuencias usando algoritmos de alineamiento como se describen en más detalle más adelante.

- En el presente contexto se considera que una secuencia de aminoácidos homóloga incluye una secuencia de aminoácidos que puede ser al menos el 90% idéntica, preferentemente al menos el 95, 96, 97, 98 o el 99% idéntica a la secuencia. Normalmente, los homólogos comprenderán los mismos sitios activos etc., por ejemplo, que la secuencia de aminoácidos objeto. Aunque la homología también puede considerarse en términos de similitud (es decir, residuos de aminoácidos que tienen propiedades/funciones químicas similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencias.

Por "fragmento funcional" se indica un fragmento del polipéptido que retiene esas propiedades características de ese polipéptido. En el contexto de la presente invención, un fragmento funcional de una enzima fitasa es un fragmento que retiene la capacidad de escisión de carotenoides de la proteína completa.

- 45 En el presente contexto se considera que una secuencia de nucleótidos homóloga incluye una secuencia de nucleótidos que puede ser al menos el 90% idéntica, preferentemente al menos el 95, 96, 97, 98 o el 99% idéntica a una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima de la presente invención (la secuencia objeto). Normalmente, los homólogos comprenderán las mismas secuencias que codifican los sitios activos, etc., que la secuencia objeto. Aunque la homología también puede considerarse en términos de similitud (es decir, residuos de aminoácidos que tienen propiedades/funciones químicas similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencias.

Para las secuencias de aminoácidos y las secuencias de nucleótidos, las comparaciones de homología pueden realizarse a simple vista, o más normalmente, con la ayuda de programas de comparación de secuencias fácilmente

disponibles. Estos programas informáticos comercialmente disponibles pueden calcular el % de homología entre dos o más secuencias.

5 El % de homología puede calcularse sobre secuencias contiguas, es decir, una secuencia está alineada con la otra secuencia y cada aminoácido en una secuencia se compara directamente con el aminoácido correspondiente en la otra secuencia, un residuo cada vez. Esto se llama un alineamiento "sin huecos". Normalmente, tales alineamientos sin huecos se realizan sólo sobre un número de residuos relativamente corto.

10 Aunque esto es un procedimiento muy simple y coherente, fracasa en tener en cuenta que, por ejemplo, en un par de otro modo idéntico de secuencias, una inserción o delección hará que los siguientes residuos de aminoácidos se saquen del alineamiento, produciendo así potencialmente una gran reducción en el % de homología cuando se realiza un alineamiento global. Por consiguiente, la mayoría de los procedimientos de comparación de secuencias se diseñan para producir alineamientos óptimos que tienen en cuenta posibles inserciones y delecciones sin penalizar excesivamente la puntuación de homología global. Esto se logra insertando "huecos" en un alineamiento de secuencias para probar maximizar la homología local.

15 Sin embargo, estos procedimientos más complejos asignan "penalizaciones por hueco" a cada hueco que se produce en un alineamiento de manera que, para el mismo número de aminoácidos idénticos, un alineamiento de secuencias con tan pocos huecos como sea posible, que refleja mayor relación entre las dos secuencias comparadas, logrará una mayor puntuación que uno con muchos huecos. "Costes por huecos afines" se usan normalmente para cargar un coste relativamente alto para la existencia de un hueco y una penalización más pequeña para cada residuo posterior en el hueco. Este es el sistema de puntuación de huecos más comúnmente usado. Altas penalizaciones por huecos producirán por supuesto alineamientos optimizados con menos huecos. La mayoría de los programas de alineamiento permiten modificar las penalizaciones por huecos. Sin embargo, se prefiere usar los valores por defecto si se usa tal software para comparaciones de secuencias. Por ejemplo, si se usa el paquete GCG Wisconsin Bestfit, la penalización por hueco por defecto para secuencias de aminoácidos es -12 para un hueco y -4 para cada extensión.

25 Por tanto, el cálculo del % de homología máximo requiere en primer lugar la producción de un alineamiento óptimo teniendo en cuentas las penalizaciones por hueco. Un programa informático adecuado para llevar a cabo un alineamiento tal es el paquete GCG Wisconsin Bestfit (Devereux y col. 1984 Nuc. Acids Research 12 p387). Ejemplos de otro software que puede realizar las comparaciones de secuencias incluyen, pero no se limitan a, el paquete BLAST (véase Ausubel y col., 1999 Short Protocols in Molecular Biology, 4ª ed - Capítulo 18), FASTA (Altschul y col., 1990 J. Mol. Biol. 403-410) y el conjunto GENWORKS de herramientas de comparación. Tanto BLAST como FASTA están disponibles para la búsqueda fuera de línea y en línea (véase Ausubel y col., 1999, Short Protocols in Molecular Biology, páginas 7-58 a 7-60).

35 Sin embargo, para algunas aplicaciones, se prefiere usar el programa GCG Bestfit. Una nueva herramienta, llamada BLAST 2 Sequences, también está disponible para comparar secuencia de proteínas y de nucleótidos (véase FEMS Microbiol Lett 1999 174(2): 247-50; FEMS Microbiol Lett 1999 177(1): 187-8 y tatiana@ncbi.nlm.nih.gov).

40 Aunque el % de homología final puede medirse en términos de identidad, el proceso de alineamiento por sí mismo no se basa normalmente en una comparación de pares todo o nada. En su lugar, generalmente se usa una matriz de puntuaciones de similitud normalizada que asigna puntuaciones a cada comparación por emparejamiento basándose en la similitud química o distancia de evolución. Un ejemplo de una matriz tal comúnmente usada es la matriz BLOSUM62, la matriz por defecto para el conjunto BLAST de programas. Los programas GCG Wisconsin generalmente usan tanto los valores por defecto públicos como una tabla de comparación de símbolos a medida si se suministra (véase el manual de usuario para más detalles). Para algunas aplicaciones se prefiere usar los valores por defecto públicos para el paquete GCG o, en el caso de otro software, la matriz por defecto, tal como BLOSUM62.

45 Alternativamente, el porcentaje de homologías puede calcularse usando la característica de múltiples alineamientos en DNASIS™ (Hitachi Software), basado en un algoritmo, análogo a CLUSTAL (Higgins DG & Sharp PM (1988), Gene 73(1), 237-244).

Una vez que el software ha producido un alineamiento óptimo es posible calcular el % de homología, preferentemente el % de identidad de secuencias. El software hace normalmente esto como parte de la comparación de secuencias y genera un resultado numérico.

50 Las secuencias también pueden tener delecciones, inserciones o sustituciones de residuos de aminoácidos que producen un cambio silencioso y que producen una sustancia funcionalmente equivalente. Las sustituciones deliberadas de aminoácidos pueden hacerse basándose en la similitud en las propiedades de aminoácidos (tales como polaridad, carga, solubilidad, hidrofobia, hidrofilia y/o la naturaleza anfipática de los residuos) y, por tanto, es útil para agrupar aminoácidos juntos en grupos funcionales. Los aminoácidos pueden agruparse juntos basándose en las propiedades de su cadena lateral sola. Sin embargo, también es más útil incluir datos de mutación. Por tanto, es probable que los conjuntos de aminoácidos así derivados se conserven por motivos estructurales. Estos conjuntos pueden describirse 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. 119; 205-218). Las sustituciones conservativas pueden hacerse, por ejemplo, según la siguiente tabla que describe un diagrama de Venn generalmente aceptado que agrupa aminoácidos.

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
		Positivamente cargado	H K R
		Negativamente cargado	E D
Pequeño	V C A G S P T N D	Minúsculo	A G S

5 La presente invención también engloba sustituciones o mutaciones conservativas u homólogas (sustitución y reemplazo se usan ambos en el presente documento para significar el intercambio de un residuo de aminoácido existente con un residuo alternativo) que pueden producirse, es decir, sustitución de igual a igual. Por tanto, el término "mutación conservativa" se refiere a una mutación de aminoácidos que un experto en la materia consideraría conservativa para una primera mutación. "Conservativa" en este contexto significa conservar o invariable en términos de características de aminoácido. Si, por ejemplo, una mutación conduce en una posición específica a una sustitución de un residuo de aminoácido aromático (por ejemplo, Tyr) con un residuo de aminoácido alifático (por ejemplo, Leu), entonces una sustitución en la misma posición con un aminoácido alifático diferente (por ejemplo, Ile o Val) se denomina una mutación conservativa. Adicionalmente, las características de aminoácidos incluyen tamaño del residuo, hidrofobia, polaridad, carga, valor de pK y otras características de aminoácidos conocidas en la técnica. Por consiguiente, una mutación conservativa puede incluir sustitución tal como básico con básico, ácido con ácido, polar con polar etc.

También puede producirse la sustitución no conservativa, es decir, de una clase de residuo a otra o que alternativamente implica la inclusión de aminoácidos no naturales tales como ornitina (denominada en lo sucesivo Z), ácido diaminobutírico-ornitina (denominada en lo sucesivo B), norleucina-ornitina (denominada en lo sucesivo O), piridilalanina, tienilalanina, naftilalanina y fenilglicina.

Los reemplazos también pueden hacerse con aminoácidos no naturales.

Secuencias de aminoácidos de variantes pueden incluir grupos espaciadores adecuados que pueden insertarse entre cualquiera dos residuos de aminoácidos de la secuencia que incluyen grupos alquilo tales como grupos metilo, etilo o propilo, además de espaciadores de aminoácidos tales como residuos de glicina o  $\beta$ -alanina. Otra forma de variación implica la presencia de uno o más residuos de aminoácidos en forma peptoide, será bien entendido por aquellos expertos en la materia. Para evitar dudas, "la forma peptoide" se usa para referirse a residuos de aminoácidos de variantes en los que el grupo sustituyente del carbono  $\alpha$  está sobre el átomo de nitrógeno del residuo en vez del carbono  $\alpha$ . Los procedimientos para preparar péptidos en la forma peptoide se conocen en la técnica, por ejemplo, Simon RJ y col., PNAS (1992) 89(20), 9367-9371 y Horwell DC, Trends Biotechnol. (1995) 13(4), 132-134.

#### Nomenclatura

En la presente invención se usan códigos de una letra y de tres letras convencionales para residuos de aminoácidos. Para facilidad de referencia, las mutaciones en variantes de enzima se describen usando la siguiente nomenclatura: residuo de aminoácido en la enzima parental; posición; residuo(s) de aminoácido sustituido(s). Según esta nomenclatura, la sustitución de, por ejemplo, un residuo de alanina con un residuo de glicina en la posición 20 se indica como Ala20Gly o A20G. La delección de alanina en la misma posición se muestra como Ala20\* o A20\*. La inserción de un residuo de aminoácido adicional (por ejemplo, una glicina) se indica como Ala20AlaGly o A20AG. La delección de un estiramiento consecutivo de residuos de aminoácidos (por ejemplo, entre la alanina en la posición 20 y la glicina en la posición 21) se indica como  $\Delta$ (Ala20-Gly21) o  $\Delta$ (A20-G21). Si una secuencia de enzima parental contiene una delección en comparación con la secuencia de enzima usada para la numeración, una inserción en una posición tal (por ejemplo, una alanina en la posición delecionada 20) se indica como \*20Ala o \*20A. Múltiples mutaciones se separan por un signo más o una barra oblicua. Por ejemplo, dos mutaciones en las posiciones 20 y 21 que sustituyen alanina y ácido glutámico con glicina y serina, respectivamente, se indican como A20G+E21S o A20G/B21S. Si un residuo de aminoácido en una posición dada está sustituido con dos o más residuos de aminoácidos alternativos, estos residuos se separan por una coma o una barra oblicua. Por ejemplo, la sustitución de alanina en la posición 30 con tanto glicina como ácido glutámico se indica como A20G,E o A20G/E, o A20G,

- 5 A20E. Si una posición adecuada para la modificación se identifica en el presente documento sin ninguna modificación específica que se sugiera, debe entenderse que cualquier residuo de aminoácido puede estar sustituido con el residuo de aminoácido presente en la posición. Por tanto, por ejemplo, si una modificación de una alanina en la posición 20 se menciona, pero no se especifica, debe entenderse que la alanina puede delecionarse o sustituirse con cualquier otro residuo de aminoácido (es decir, uno cualquiera de R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V).
- 10 Las secuencias de nucleótidos para su uso en la presente invención pueden incluir dentro de ellas nucleótidos sintéticos o modificados. En la técnica se conocen varios tipos de modificación diferentes para oligonucleótidos. Éstos 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 fines de la presente invención debe entenderse que las secuencias de nucleótidos descritas en el presente documento pueden modificarse mediante cualquier procedimiento disponible en la materia. Tales modificaciones pueden llevarse a cabo con el fin de potenciar la actividad *in vivo* o la duración de secuencias de nucleótidos de la presente invención.
- 15 En el presente documento también se describe el uso de secuencias de nucleótidos que son complementarias a las secuencias presentadas en el presente documento, o cualquier derivado, fragmento o derivado de las mismas. Si la secuencia es complementaria a un fragmento de la misma, entonces esa secuencia puede usarse como sonda para identificar secuencias codificantes similares en otros organismos, etc.
- 20 Los polinucleótidos que no son el 100% homólogos a las secuencias de la presente invención, pero que se encuentran dentro del alcance de la invención, pueden obtenerse en varias formas. Otras variantes de las secuencias descritas en el presente documento pueden obtenerse, por ejemplo, sondando bibliotecas de ADN preparadas a partir de una serie de individuos, por ejemplo, individuos de diferentes poblaciones. Además, pueden obtenerse otros homólogos y tales homólogos y fragmentos de los mismos podrán hibridarse en general selectivamente con las secuencias mostradas en el listado de secuencias en el presente documento. Tales secuencias pueden obtenerse sondando bibliotecas de ADNc preparadas a partir de o bibliotecas de ADN genómico de otras especies, y sondando tales bibliotecas con sondas que comprenden toda o parte de una cualquiera de las secuencias en los listados de secuencias adjuntos en condiciones de media a alta rigurosidad. Se aplican consideraciones similares para obtener homólogos de especies y variantes alélicas de las secuencias de polipéptidos o de nucleótidos de la invención.
- 25 Las variantes y homólogos de cepas/especies también pueden obtenerse usando PCR degenerada que usará cebadores diseñados para secuencias diana dentro de las variantes y homólogos que codifican secuencias de aminoácidos conservadas dentro de las secuencias de la presente invención. Las secuencias conservadas pueden predecirse, por ejemplo, alineando las secuencias de aminoácidos de varias variantes/homólogos. Los alineamientos de secuencias pueden realizarse usando software informático conocido en la técnica. Por ejemplo, el programa GCG Wisconsin PileUp se usa ampliamente.
- 30 Los cebadores usados en PCR degenerada contendrán una o más posiciones degeneradas y se usarán a condiciones de rigurosidad inferiores a las usadas para clonar secuencias con cebadores de una única secuencia contra secuencias conocidas.
- 35 Alternativamente, tales polinucleótidos pueden obtenerse por mutagénesis dirigida a sitio de secuencias caracterizadas. Esto puede ser útil cuando se requieran, por ejemplo, cambios de secuencias de codones silenciosos para optimizar preferencias de codones para una célula huésped particular en la que las secuencias de polinucleótidos están siendo expresadas. Pueden desearse otros cambios de secuencias con el fin de introducir sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, o para alterar la propiedad o función de los polipéptidos codificados por los polinucleótidos.
- 40 Los polinucleótidos (secuencias de nucleótidos) de la invención pueden usarse para producir un cebador, por ejemplo, un cebador de PCR, un cebador para una reacción de amplificación alternativa, una sonda, por ejemplo, marcada con una marca reveladora mediante medios convencionales usando marcas radiactivas o no radiactivas, o los polinucleótidos pueden clonarse en vectores. Tales cebadores, sondas y otros fragmentos tendrán al menos 15, preferentemente al menos 20, por ejemplo, al menos 25, 30 ó 40 nucleótidos de longitud, y también están englobados por el término polinucleótidos de la invención como se usa en el presente documento.
- 45 Los polinucleótidos tales como polinucleótidos y sondas de ADN según la invención pueden producirse recombinantemente, sintéticamente, o mediante cualquier medio disponible para aquellos expertos en la materia. También pueden clonarse por técnicas convencionales.
- 50 En general, los cebadores se producirán por medios sintéticos, que implica una fabricación escalonada de la secuencia de ácidos nucleicos deseada un nucleótido cada vez. Técnicas para llevar a cabo esto usando técnicas automatizadas están fácilmente disponibles en la materia.
- 55 Generalmente se producirán polinucleótidos más largos usando medios recombinantes, por ejemplo, usando

técnicas de clonación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Los cebadores pueden diseñarse para contener sitios de reconocimiento de enzimas de restricción adecuados de manera que el ADN amplificado pueda clonarse en un vector de clonación adecuado.

### **BIOLÓGICAMENTE ACTIVAS**

- 5 Preferentemente, las secuencias de variantes, etc., son al menos tan biológicamente activas como las secuencias presentadas en el presente documento.

10 Como se usa en el presente documento, "biólogicamente activo" se refiere a una secuencia que tiene una función estructural similar (pero no necesariamente al mismo grado) y/o función reguladora similar (pero no necesariamente al mismo grado) y/o función bioquímica similar (pero no necesariamente al mismo grado) de la secuencia que se produce naturalmente.

15 En particular, las secuencias de variantes o formas modificadas de las mismas tienen un perfil enzimático similar al perfil de la fitasa identificada en el presente documento. Este perfil incluye características tales como ser una proteína secretada que tiene un pH óptimo en el intervalo de pH 2 a 5,5, preferentemente 3,0 a 3,5, retener al menos el 50% de la actividad máxima con respecto al intervalo de pH 2,0-5,5 y/o tener una actividad específica superior a 1000 U/mg.

### **HIBRIDACIÓN**

En el presente documento también se describen secuencias que son complementarias a las secuencias de ácidos nucleicos de la presente invención y secuencias que pueden hibridarse tanto con las secuencias de la presente invención como con secuencias que son complementarias a las mismas.

- 20 El término "hibridación" como se usa en el presente documento debe incluir "el procedimiento por el que una cadena de ácido nucleico se une con una cadena complementaria por apareamiento de bases", además del procedimiento de amplificación como se lleva a cabo en la tecnología de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

25 La presente descripción también desvela el uso de secuencias de nucleótidos que pueden hibridarse con las secuencias que son complementarias a las secuencias presentadas en el presente documento, o cualquier derivado, fragmento o derivado de las mismas.

El término "variante" también engloba secuencias que son complementarias a secuencias que pueden hibridarse con las secuencias de nucleótidos presentadas en el presente documento.

- 30 Preferentemente, el término "variante" engloba secuencias que son complementarias a secuencias que pueden hibridarse bajo condiciones rigurosas (por ejemplo 50°C y 0,2xSSC {1xSSC = NaCl 0,15 M, Na<sub>3</sub>citrato 0,015 M a pH,7,0}) con las secuencias de nucleótidos presentadas en el presente documento.

Más preferentemente, el término "variante" engloba secuencias que son complementarias a secuencias que pueden hibridarse bajo condiciones rigurosas altas (por ejemplo 65°C y 0,1xSSC {1xSSC = NaCl 0,15 M, Na<sub>3</sub>citrato 0,015 M a pH 7,0}) con las secuencias de nucleótidos presentadas en el presente documento.

- 35 La descripción también describe secuencias de nucleótidos que pueden hibridarse con las secuencias de nucleótidos de la presente invención (incluyendo secuencias complementarias de aquellas presentadas en el presente documento).

En el presente documento también se describen secuencias de nucleótidos que son complementarias a secuencias que pueden hibridarse con las secuencias de nucleótidos de la presente invención (incluyendo secuencias complementarias de aquellas presentadas en el presente documento).

- 40 En el presente documento también se describen secuencias de polinucleótidos que pueden hibridarse con las secuencias de nucleótidos presentadas en el presente documento en condiciones de rigurosidad intermedia a máxima.

45 En el presente documento también se describen secuencias de nucleótidos que pueden hibridarse con la secuencia de nucleótidos de la presente invención, o el complemento de la misma, bajo condiciones rigurosas (por ejemplo, 50°C y 0,2xSSC).

En el presente documento también se describen secuencias de nucleótidos que pueden hibridarse con la secuencia de nucleótidos de la presente invención, o el complemento de la misma, bajo condiciones rigurosas altas (por ejemplo, 65°C y 0,1xSSC).

### **MUTAGÉNESIS DIRIGIDA A SITIO**

- 50 Una vez se ha aislado y/o purificado una secuencia de nucleótidos que codifica enzima, o se ha identificado una

secuencia de nucleótidos putativa que codifica enzima, puede desearse mutar la secuencia con el fin de preparar una enzima de la presente invención.

Las mutaciones pueden introducirse usando oligonucleótidos sintéticos. Estos oligonucleótidos contienen secuencias de nucleótidos que flanquean los sitios de mutación deseados.

- 5 Un procedimiento adecuado se desvela en Morinaga y col. (Biotechnology (1984) 2, p646-649). Otro procedimiento de introducir mutaciones en secuencias de nucleótidos que codifican enzima se describe en Nelson y Long (Analytical Biochemistry (1989), 180, p 147-151). Otro procedimiento se describe en Sarkar y Sommer (Biotechniques (1990), 8, p404-407 - "The megaprimer method of site directed mutagenesis").

#### **RECOMBINANTE**

- 10 En un aspecto, la secuencia para su uso en la presente invención es una secuencia recombinante, es decir, una secuencia que ha sido preparada usando técnicas de ADN recombinante.

Estas técnicas de ADN recombinante están dentro de las capacidades de un experto en la materia. 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, Books 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

#### **15 SINTÉTICA**

En un aspecto, la secuencia para su uso en la presente invención es una secuencia sintética, es decir, una secuencia que ha sido preparada por síntesis química o enzimática *in vitro*. Incluye, pero no se limita a, secuencias preparadas con uso de codones óptimo para organismos huésped tal como las levaduras metilotróficas *Pichia* y *Hansenula*.

#### **20 EXPRESIÓN DE ENZIMAS**

La secuencia de nucleótidos para su uso en la presente invención puede incorporarse en un vector replicable recombinante. El vector puede usarse para replicar y expresar la secuencia de nucleótidos, en forma de enzima en y/o a partir de una célula huésped compatible.

La expresión puede controlarse usando secuencias de control, por ejemplo, secuencias reguladoras.

- 25 La enzima producida por una célula recombinante huésped por expresión de la secuencia de nucleótidos puede secretarse o puede contenerse intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o el vector usado. Las secuencias codificantes pueden diseñarse con secuencias señal que potencian la secreción directa de las secuencias codificantes de sustancia mediante una membrana celular procariota o eucariota particular.

Ventajosamente, las enzimas de la presente invención son secretadas.

#### **30 VECTOR DE EXPRESIÓN**

Los términos "plásmido", "sistema de vector" o "vector de expresión" significan una construcción que puede expresarse *in vivo* o *in vitro*. En el contexto de la presente invención, estas construcciones pueden usarse para introducir genes que codifican enzimas en células huésped. Adecuadamente, los genes cuya expresión se introduce pueden denominarse "transgenes expresables".

- 35 Preferentemente, el vector de expresión se incorpora en el genoma de un organismo huésped adecuado. El término "incorporado" cubre preferentemente la incorporación estable en el genoma.

- 40 Las secuencias de nucleótidos descritas en el presente documento 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 ligada a secuencias reguladoras que pueden proporcionar la expresión de la secuencia de nucleótidos por un organismo huésped adecuado.

Los vectores para su uso en la presente invención pueden transformarse en una célula huésped adecuada como se describe más adelante para proporcionar la expresión de un polipéptido de la presente invención.

La elección de vector, por ejemplo, un plásmido, cósmido o vector de fago dependerá frecuentemente de la célula huésped en la que va a introducirse.

- 45 Los vectores para su uso en la presente invención pueden contener uno o más genes del marcador de selección tales como un gen que confiere resistencia a antibióticos, por ejemplo, resistencia a ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Alternativamente, la selección puede llevarse a cabo por co-transformación (como se describe en el documento WO91/17243).

Los vectores pueden usarse *in vitro*, por ejemplo, para la producción de ARN o usarse para transfectar, transformar, transducir o infectar una célula huésped.

5 En el presente documento también se describe un procedimiento de preparación de secuencias de nucleótidos de la presente invención introduciendo una secuencia de nucleótidos de la presente invención en un vector replicable, introduciendo el vector en una célula huésped compatible y cultivando la célula huésped en condiciones que provocan la replicación del vector.

El vector puede comprender adicionalmente una secuencia de nucleótidos que permite que el vector se replique en la célula huésped en cuestión. Ejemplos de tales secuencias son los orígenes de replicación de plásmidos pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1, pU702 y pET11.

## 10 **SECUENCIAS REGULADORAS**

15 En algunas aplicaciones, la secuencia de nucleótidos para su uso en la presente invención está operativamente ligada a una secuencia reguladora que puede proporcionar la expresión de la secuencia de nucleótidos, tal como por la célula huésped elegida. A modo de ejemplo, la presente invención cubre un vector que comprende la secuencia de nucleótidos de la presente invención operativamente ligada a una secuencia reguladora tal, es decir, el vector es un vector de expresión.

El término “operativamente ligada” se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar en su modo previsto. Una secuencia reguladora “operativamente ligada” a una secuencia codificante está ligada de tal forma que la expresión de la secuencia codificante se logra bajo condición compatible con las secuencias de control.

20 El término “secuencias reguladoras” incluye promotores y potenciadores y otras señales de regulación de la expresión.

El término “promotor” se usa en el sentido normal de la materia, por ejemplo, un sitio de unión a ARN polimerasa.

25 La expresión potenciada de la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima de la presente invención también puede lograrse por la selección de regiones reguladoras heterólogas, por ejemplo, regiones promotoras, conductoras y terminadoras de la secreción.

Preferentemente, la secuencia de nucleótidos según la presente invención está operativamente ligada a al menos un promotor.

Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de la secuencia de nucleótidos en un huésped bacteriano, fúngico o de levadura son muy conocidos en la técnica.

## 30 **CONSTRUCCIONES**

El término “construcción”, que es sinónimo a términos tales como “conjugado”, “casete” e “híbrido”, incluye una secuencia de nucleótidos para su uso según la presente invención directamente o indirectamente unida a un promotor.

35 Un ejemplo de una unión indirecta es la provisión de un grupo espaciador adecuado tal como una secuencia de intrones, tal como el intrón Sh1 o el intrón ADH, intermedia a la secuencia promotora y de nucleótidos de la presente invención. Lo mismo es cierto para el término “fusionado” en relación con la presente invención, que incluye unión directa o indirecta. En algunos casos, los términos no cubren la combinación natural de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína generalmente asociada al promotor del gen natural y cuando están ambos en su entorno natural.

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

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

## **CÉLULAS HUÉSPED**

45 El término “célula huésped” en relación con la presente invención incluye cualquier célula que comprenda tanto la secuencia de nucleótidos como un vector de expresión como se ha descrito anteriormente y que se usa en la producción recombinante de una enzima que tiene las propiedades específicas que se definen en el presente documento o en los procedimientos de la presente invención.

50 Por tanto, otra realización de la presente invención proporciona células huésped transformadas o transfectadas con una secuencia de nucleótidos que expresa las enzimas descritas en la presente invención. Las células se elegirán

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

Ejemplos de organismos bacterianos huésped adecuados son especies de bacterias Gram-positivas o Gram-negativas.

- 5 Dependiendo de la naturaleza de la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima de la presente invención, y/o la deseabilidad de procesar adicionalmente la proteína expresada, pueden preferirse huéspedes eucariotas tales como levaduras u otros hongos. En general se prefieren células de levadura con respecto a células fúngicas debido a que son más fáciles de manipular. Sin embargo, algunas proteínas son tanto escasamente secretadas de la célula de levadura, como en algunos casos no se procesan apropiadamente (por ejemplo, hiperglucosilación en levadura).  
10 En estos casos debería seleccionarse un organismo huésped fúngico diferente.

El uso de células huésped adecuadas, tal como células huésped de levadura, fúngicas y de planta, puede proporcionar modificaciones pos-traduccionales (por ejemplo, miristoilación, glucosilación, truncación, lapidación y fosforilación de tirosina, serina o treonina) como pueden necesitarse para conferir actividad biológica óptica a productos de expresión recombinantes de la presente invención.

- 15 La célula huésped puede ser una cepa deficiente en proteasa o proteasa menos.

El genotipo de la célula huésped puede modificarse para mejorar la expresión.

Ejemplos de modificaciones de células huésped incluyen deficiencia de proteasas, suplementación de ARNt raros y modificación del potencial reductor en el citoplasma para potenciar la formación de enlaces disulfuro.

- 20 Por ejemplo, la célula huésped *E. coli* puede expresar en exceso ARNt raros para mejorar la expresión de proteínas heterólogas que se ejemplifican/describen 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 huésped puede ser deficiente en varias enzimas reductoras, favoreciéndose así la formación de enlaces disulfuro estables como se ejemplifica/describe en Bessette (Proc Natl Acad Sci USA (1999), 96, 13703-13708 "Efficient folding of proteins with multiple disulphide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm").

- 25 En una realización, células huésped en el contexto de la presente invención incluyen aquellas células que pueden añadirse directamente a pienso animal.

### ORGANISMO

- 30 El término "organismo" en relación con la presente descripción incluye cualquier organismo que pueda comprender la secuencia de nucleótidos que codifica las enzimas que se describen en la presente invención y/o productos obtenidos a partir de las mismas y/o en el que un promotor puede permitir la expresión de la secuencia de nucleótidos según la presente invención cuando está presente en el organismo.

Organismos adecuados pueden incluir un procariota, hongo, levadura o una planta.

- 35 El término "organismo transgénico" en relación con la presente descripción incluye cualquier organismo que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica las enzimas que se describen en la presente invención y/o los productos obtenidos a partir de las mismas, y/o en el que un promotor puede permitir la expresión de la secuencia de nucleótidos según la presente invención dentro del organismo. Preferentemente, la secuencia de nucleótidos se incorpora en el genoma del organismo.

El término "organismo transgénico" no cubre secuencias codificantes de nucleótidos nativas en su entorno natural cuando están bajo el control de su promotor nativo que también está en su entorno natural.

- 40 Por tanto, el organismo transgénico de la presente descripción incluye un organismo que comprende una cualquiera de, o combinaciones de, la secuencia de nucleótidos que codifica las enzimas que se describe en la presente invención, construcciones según la presente invención, vectores según la presente invención, plásmidos según la presente invención, células según la presente invención, tejidos según la presente invención, o los productos de los mismos.

- 45 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 HUÉSPED/ORGANISMO

Como se indica anteriormente, el organismo huésped puede ser un organismo procariota o eucariota. Ejemplos de huéspedes procariotas adecuados incluyen *E. coli* y *Bacillus subtilis*.

- 50 Las enseñanzas de la transformación de huéspedes procariotas están muy documentadas en la materia, por

ejemplo, véase Sambrook y col. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Otros procedimientos adecuados se explican en los ejemplos en el presente documento. Si se usa un huésped procariota, entonces la secuencia de nucleótidos puede necesitar modificarse adecuadamente antes de la transformación, tal como mediante la eliminación de intrones.

5 Las células de hongos filamentosos pueden transformarse usando diversos procedimientos conocidos en la técnica, tales como un procedimiento que implica la formación de protoplastos y la transformación de los protoplastos, seguido de regeneración de la pared celular de un modo conocido. El uso de *Aspergillus* como microorganismo huésped se describe en el documento EP 0 238 023.

10 Otro organismo huésped puede ser una planta. Una revisión de las técnicas generales usadas para transformar plantas puede encontrarse en artículos por Potrykus (Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol [1991] 42:205-225) y Christou (Agro-Food-Industry Hi-Tech Marzo/Abril 1994 17-27). Otras enseñanzas sobre la transformación de plantas puede encontrarse en el documento EP-A-0449375.

Enseñanzas generales sobre la transformación de hongos, levaduras y plantas se presentan en las siguientes secciones.

### 15 HONGO TRANSFORMADO

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

20 Las enseñanzas sobre la transformación de hongos filamentosos se revisan en el documento US-A-5741665 que establece que técnicas convencionales para la transformación de hongos filamentosos y el cultivo de los hongos son muy conocidas en la técnica. Una amplia revisión de técnicas como se aplican a *N. crassa* se encuentra, por ejemplo, en Davis y de Serres, Methods Enzymol (1971) 17A: 79-143.

Otras enseñanzas sobre la transformación de hongos filamentosos se revisan en el documento US-A-5674707.

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

25 Un *Aspergillus* transgénico según la presente descripción también puede prepararse siguiendo, por ejemplo, las enseñanzas de Turner G. 1994 (Vectors for genetic manipulation. En: Martinelli S.D., Kinghorn J.R. (Editors) *Aspergillus: 50 years on*. Progress in industrial microbiology vol 29. Elsevier Amsterdam 1994. pág. 641-666).

La expresión génica en hongos filamentosos ha sido revisada en Punt y col. (2002) Trends Biotechnol 2002 May; 20(5):200-6, Archer & Peberdy Crit Rev Biotechnol (1997) 17(4):273-306.

### 30 LEVADURA TRANSFORMADA

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

Una revisión de los principios de expresión génica heteróloga en levadura se proporcionan en, por ejemplo, Methods Mol Biol (1995), 49:341-54, y Curr Opin Biotechnol (1997) Oct; 8(5):554-60

35 A este respecto, la levadura, tal como las especies *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris* (véase FEMS Microbiol Rev (2000 24(1):45-66)), puede usarse como vehículo para la expresión génica heteróloga.

Una revisión de los principios de expresión génica heteróloga en *Saccharomyces cerevisiae* y la secreción de productos génicos se facilita por E Hinchcliffe E Kenny (1993, "Yeast as a vehicle for expression of the heterologous genes", Yeasts, vol 5, Anthony H Rose y J Stuart Harrison, eds, 2ª edición, Academic Press Ltd.).

40 Para la transformación de levadura se han desarrollado varios protocolos de transformación. Por ejemplo, un *Saccharomyces* transgénico según la presente descripción puede prepararse por las siguientes enseñanzas de Hinnen y col., (1978, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 75, 1929); Beggs, J D (1978, Nature, Londres, 275, 104); y Ito, H y col. (1983, J Bacteriology 153, 163-168).

Las células de levadura transformadas pueden seleccionarse usando diversos marcadores selectivos, tales como marcadores auxotróficos de marcadores de resistencia a antibióticos dominantes.

### 45 PLANTAS/CÉLULAS DE PLANTA TRANSFORMADAS

Un organismo huésped adecuado para la presente invención puede ser una planta. Una revisión de las técnicas generales puede encontrarse en artículos por 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 huésped transformadas con la secuencia de nucleótidos de la presente invención pueden cultivarse en condiciones propicias para la producción de la enzima codificada y que facilitan la recuperación de la enzima de las células y/o medio de cultivo.

- 5 El medio usado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para cultivar la célula huésped en cuestión y obtener la expresión de la enzima.

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

La enzima puede secretarse de las células huésped y puede recuperarse convenientemente del medio de cultivo usando procedimientos muy conocidos.

**10 SECRECIÓN**

Puede ser deseable que la enzima se secrete del huésped de expresión en el medio de cultivo del que la enzima puede recuperarse más fácilmente. Según la presente invención, la secuencia conductora de la secreción puede seleccionarse basándose en el huésped de expresión deseado. Las secuencias señal de híbridos también pueden usarse con el contexto de la presente invención.

- 15 Ejemplos típicos de secuencias conductoras de la secreción heterólogas son aquellas que se originan a partir del gen de amiloglucosidasa fúngica (AG) (*glaA* – las versiones de tanto 18 como 24 aminoácidos, por ejemplo, de *Aspergillus*), el gen del factor a (levaduras, por ejemplo, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* y *Hansenula*) o el gen de  $\alpha$ -amilasa (*Bacillus*).

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

**DETECCIÓN**

En la técnica se conocen una variedad de protocolos para detectar y medir la expresión de la secuencia de aminoácidos. Ejemplos incluyen enzimoanálisis de adsorción (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS).

- 25 Aquellos expertos en la materia conocen una amplia variedad de marcas y técnicas de conjugación y pueden usarse en diversos ensayos de ácidos nucleicos y de aminoácidos.

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

- 30 Moléculas indicadoras adecuadas o marcas incluyen aquellos radionúclidos, enzimas, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes o cromogénicos, además de sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares. Las patentes que enseñan el uso de tales marcas incluyen los documentos 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.

Por tanto, pueden producirse inmunoglobulinas recombinantes como se muestra en el documento US-A-4.816.567.

- 35 Otros ensayos adecuados para detectar actividad de fitasa se conocen en la técnica y se ejemplifican en el presente documento.

**PROTEÍNAS DE FUSIÓN**

La secuencia de aminoácidos para su uso según la presente invención puede producirse como una proteína de fusión, por ejemplo, para ayudar en la extracción y purificación. Ejemplos de componentes de proteína de fusión incluyen glutatión-S-transferasa (GST), 6xHis, GAL4 (dominios de unión a ADN y/o de activación de la transcripción) y ( $\beta$ -galactosidasa). También puede ser conveniente incluir un sitio de escisión proteolítica entre el componente de la proteína de fusión y la secuencia de la proteína de interés para permitir la eliminación de las secuencias de las proteínas de fusión.

- 40 Preferentemente, la proteína de fusión no dificultará la actividad de la secuencia de proteínas.

Los sistemas de expresión de fusión de genes en *E. coli* se han revisado en *Curr Opin Biotechnol* (1995) 6(5):501-6.

- 45 En otra realización de la invención, la secuencia de aminoácidos puede ligarse a una secuencia heteróloga para codificar una proteína de fusión. Por ejemplo, para cribar bibliotecas de péptidos para agentes que pueden afectar la actividad de la sustancia puede ser útil codificar una sustancia química que expresa un epítope heterólogo que es reconocido por un anticuerpo comercialmente disponible.

**SECUENCIAS ADICIONALES**

Las secuencias para su uso según la presente invención también pueden usarse conjuntamente con una o más proteínas de interés (POI) adicionales o secuencias de nucleótidos de interés (NOI).

- 5 Ejemplos no limitantes de POI incluyen: xilanasas, lipasas, fosfatasa ácida y/u otras. Éstas incluyen enzimas que, por ejemplo, modulan la viscosidad del pienso. El NOI puede incluso ser una secuencia antisentido para cualquiera de aquellas secuencias.

La POI puede incluso ser una proteína de fusión, por ejemplo, para ayudar en la extracción y purificación o para potenciar el metabolismo del fitato *in vivo*.

La POI puede incluso fusionarse con una secuencia de secreción.

- 10 Otras secuencias también pueden facilitar la secreción o aumento del rendimiento de POI secretada. Tales secuencias podrían codificar proteínas de chaperona como, por ejemplo, el producto del gen *cyp B* de *Aspergillus niger* descrito en la solicitud de patente de GB 9821198.0.

- 15 El NOI que codifica POI puede manipularse con el fin de alterar su actividad por varios motivos que incluyen, pero no se limitan a, alteraciones que modifican el procesamiento y/o expresión del producto de expresión del mismo. A modo de otro ejemplo, el NOI también puede modificarse para optimizar la expresión en una célula huésped particular. Pueden desearse otros cambios de secuencias con el fin de introducir sitios de reconocimiento de enzimas de restricción.

El NOI que codifica POI puede incluir dentro de él nucleótidos sintéticos o modificados tales como esqueletos de metilfosfonato y fosforotioato.

- 20 El NOI que codifica POI puede modificarse para aumentar la estabilidad intracelular y semivida. Posibles modificaciones incluyen, pero no se limitan a, la adición de 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 fosfodiéstera dentro del esqueleto de la molécula.

**ANTICUERPOS – sólo para referencia**

- 25 Un aspecto de la presente descripción se refiere a aminoácidos que son inmunológicamente reactivos con el aminoácido de SEC ID N<sup>o</sup>. 3.

Los anticuerpos pueden producirse por técnicas convencionales, tales como por inmunización con la sustancia de la invención o usando una biblioteca de expresión en fago.

- 30 Para los fines de esta descripción, el término "anticuerpo", a menos que se especifique de otro modo, incluye, pero no se limita a, policlonal, monoclonal, quimérico, monocatenario, fragmentos Fab, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, además de miméticos de los mismos. Tales fragmentos incluyen fragmentos de anticuerpos completos que retienen su actividad de unión para una sustancia diana, fragmentos Fv, F(ab') y F(ab')<sub>2</sub>, además de anticuerpos monocatenarios (scFv), proteínas de fusión y otras proteínas sintéticas que comprenden el sitio de unión a antígeno del anticuerpo. Además, los anticuerpos y fragmentos de los mismos pueden ser anticuerpos humanizados. Los anticuerpos neutralizantes, es decir, aquellos que inhiben la actividad biológica de los polipéptidos de sustancia, son especialmente preferidos para diagnósticos y terapéuticos.

- 35 Si se desean anticuerpos policlonales, un mamífero seleccionado (por ejemplo, ratón, conejo, cabra, caballo, etc.) se inmuniza con la secuencia de la presente invención (o una secuencia que comprende un epítipo inmunológico del mismo). Dependiendo de las especies huésped pueden usarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica.

- 40 El suero del animal inmunizado se recoge y se trata según procedimientos conocidos. Si el suero que contiene anticuerpos policlonales para la secuencia de la presente invención (o una secuencia que comprende un epítipo inmunológico del mismo) contiene anticuerpos para otros antígenos, los anticuerpos policlonales pueden purificarse por cromatografía de inmunoafinidad. Las técnicas para producir y procesar antiseros policlonales se conocen en la técnica. Con el fin de que tales anticuerpos puedan prepararse, la descripción también proporciona polipéptidos de la invención o fragmentos de los mismos haptinizados con otro polipéptido para su uso como inmunógenos en animales o seres humanos.

- 45 Anticuerpos monoclonales dirigidos contra la secuencia de la presente invención (o una secuencia que comprende un epítipo inmunológico del mismo) también pueden producirse fácilmente por un experto en la materia e incluyen, pero no se limitan a, la técnica de hibridomas de Koehler y Milstein (1975 Nature 256:495-497), la técnica de hibridomas de linfocitos B humanos (Kosbor y col., (1983) Immunol Today 4:72; Cote y col., (1983) Proc Natl Acad Sci 80:2026-2030) y la técnica de hibridomas de EBV (Cole y col., (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer

Therapy, Alan Rickman Liss Inc, pp 77-96).

5 Además, pueden usarse técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos", el corte y empalme de genes de anticuerpo de ratón para genes de anticuerpo humano para obtener una molécula con especificidad apropiada por antígenos y actividad biológica (Morrison y col., (1984) Proc Natl Acad Sci 81:6851-6855; Neuberger y col., (1984) Nature 312:604-608; Takeda y col., (1985) Nature 314:452-454).

Alternativamente, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (patente de EE.UU. nº 4.946.779) pueden adaptarse para producir los anticuerpos monocatenarios específicos para sustancia.

10 También pueden generarse fragmentos de anticuerpos que contienen sitios de unión específica para la sustancia. Por ejemplo, tales fragmentos incluyen, pero no se limitan a, los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> que puede producirse por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo y los fragmentos Fab que pueden generarse reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos de F(ab')<sub>2</sub>. Alternativamente pueden construirse bibliotecas de expresión de Fab para permitir la rápida y fácil identificación de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada (Huse WD y col., (1989) Science 256:1275-128 1).

### APLICACIÓN A GRAN ESCALA

15 En una realización preferida de la presente invención, la secuencia de aminoácidos que codifica una fitasa derivada de *C. freundii* o los procedimientos de la presente invención se usan para aplicaciones a gran escala. En particular, los procedimientos de la presente invención pueden usarse para la producción a gran escala de fitasas para uso industrial como aditivos/suplementos para composiciones de alimento o de pienso.

20 Preferentemente, la secuencia de aminoácidos se produce en una cantidad de 5 g por litro a aproximadamente 10 g por litro del volumen de cultivo celular total después del cultivo del organismo huésped.

Preferentemente, la secuencia de aminoácidos se produce en una cantidad de 100 mg por litro a aproximadamente 900 mg por litro del volumen de cultivo celular total después del cultivo del organismo huésped.

Preferentemente, la secuencia de aminoácidos se produce en una cantidad de 250 mg por litro a aproximadamente 500 mg por litro del volumen de cultivo celular total después del cultivo del organismo huésped.

### 25 USO DE FITASAS

Como se ha establecido anteriormente, la presente invención también se refiere a la producción de fitasas como se describe en el presente documento.

En particular, la presente descripción también se refiere al uso de las secuencias de aminoácidos como se ha desvelado en el presente documento en la producción de compuestos de fosfato orgánico e inorgánico.

30 Por tanto, la presente invención se refiere además al uso de las secuencias de nucleótidos que codifican fitasas en la generación de vectores de expresión o sistemas para la expresión de las fitasas.

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

35 La descripción se refiere además al uso de células huésped modificadas en la generación de precursores de compuestos de fosfato orgánico e inorgánico o en la generación de compuestos de fosfato orgánico específicos.

Compuestos de fosfato orgánico e inorgánico adecuados incluyen pentaquis-, tetraquis-, tris-, bis- y monofosfatos de mio-inositol.

40 Adecuadamente, en el presente documento se describe un procedimiento de producción de un compuesto de fosfato orgánico que comprende tratar el fitato con una fitasa derivada de *Citrobacter freundii*. Preferentemente, el procedimiento se caracteriza porque la enzima comprende las secuencias de aminoácidos mostradas como SEC ID N°: 3 o una secuencia que tiene al menos el 75% de identidad (homología) con la misma o un fragmento eficaz, o forma modificada de la misma. Adecuadamente, el fosfato orgánico es el fitato o todos los posibles estereoisómeros de di-, tri-, tetra- y penta-fosfatos de mio-inositol. Otros fosfatos orgánicos adecuados incluyen tetra-fosfatos de inositol y oligofosfatos de inositol. En una realización preferida, el procedimiento es un procedimiento biotecnológico *in vivo*.

45 Tales procedimientos para producir un compuesto de fosfato orgánico pueden comprender adecuadamente las etapas de:

a) proporcionar una célula huésped que comprende transgenes expresables que comprenden fitasa de *C. freundii*;

b) cultivar el organismo transgénico en condiciones adecuadas para la expresión del transgén; y

c) recuperar el compuesto de fosfato orgánico del cultivo.

Los compuestos pueden usarse para varias aplicaciones que incluyen ensayos para la caracterización de fitasas. Algunos fosfatos de inositol participan como moléculas señal en la regulación intracelular y pueden usarse productos químicos de investigación.

5 En otro aspecto se proporciona un procedimiento para la producción de alimento o pienso animal. El pienso animal se produce normalmente en molinos de pienso en los que materiales de partida se muelen primero a un tamaño de partícula adecuado y luego se mezclan con aditivos apropiados. El pienso puede luego producirse como un salvado o gránulos; lo último normalmente implica un procedimiento por el que la temperatura se eleva a un nivel diana y luego el pienso se pasa por una boquilla para producir gránulos de un tamaño particular. Posteriormente pueden añadirse aditivos líquidos tales como grasa y enzima. Se deja que los gránulos se enfríen antes del transporte. La producción de pienso animal puede también implicar una etapa adicional que incluye extrusión o expansión antes del granulado.

10 Por consiguiente, la invención proporciona además el uso de una secuencia de aminoácidos que codifica una fitasa o una célula huésped que expresa una fitasa para producir una fitasa para su uso en la fabricación de un producto de alimento o de pienso. En un aspecto se proporciona un uso de una secuencia de aminoácidos como se describe en el presente documento en la fabricación de un alimento o producto de pienso. En otro aspecto se proporciona un uso de una célula huésped según la invención en la fabricación de un alimento o producto de pienso. En otro aspecto se proporciona un uso de un vector de expresión o sistema según la invención en la fabricación de un alimento o producto de pienso.

15 La presente invención también cubre usar las enzimas como un componente de combinaciones de pienso con otros componentes para administrar a animales.

#### **COMBINACIÓN CON OTROS COMPONENTES**

Las enzimas de la presente invención pueden usarse en combinación con otros componentes o vehículos.

25 Vehículos adecuados para enzimas de pienso incluyen trigo (gruesamente molido). Además, hay varias técnicas de encapsulación que incluyen aquellas basadas en cobertura de grasa/cera, añadir gomas vegetales, etc.

30 Ejemplos de otros componentes incluyen uno o más de: espesantes, gelificantes, emulsionantes, aglutinantes, modificadores cristalinos, edulcorantes (incluyendo edulcorantes artificiales), modificadores de la reología, estabilizadores, antioxidantes, colorantes, enzimas, soportes, vehículos, excipientes, diluyentes, lubricantes, aromatizantes, materia colorante, agentes de suspensión, disgregantes, aglutinantes de granulación, etc. Estos otros componentes pueden ser naturales. Estos otros componentes pueden prepararse usando técnicas químicas y/o enzimáticas.

Como se usa en el presente documento, el término “espesante o gelificante” como se usa en el presente documento se refiere a un producto que previene la separación ralentizando o previniendo el movimiento de partículas, tanto gotitas de líquidos inmiscibles, aire como sólidos insolubles.

35 El término “estabilizador” como se usa aquí se define como un ingrediente o combinación de ingredientes que previene que un producto (por ejemplo, un producto de alimento) cambie con el tiempo.

El término “emulsionante” como se usa en el presente documento se refiere a un ingrediente (por ejemplo, un ingrediente de producto de alimento) que previene la separación de emulsiones.

40 Como se usa en el presente documento, el término “aglutinante” se refiere a un ingrediente (por ejemplo, un ingrediente de alimento) que se une junto al producto mediante una reacción física o química.

El término “modificador cristalino” como se usa en el presente documento se refiere a un ingrediente (por ejemplo, un ingrediente de alimento) que afecta la cristalización de tanto grasa como agua.

45 “Soportes” o “vehículos” significan materiales adecuados para la administración de compuestos e incluyen cualquier material tal conocido en la técnica tal como, por ejemplo, cualquier líquido, gel, disolvente, diluyente líquido, solubilizador o similares, que es no tóxico y que no interactúa con ningún componente de la composición en un modo perjudicial.

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

50 Ejemplos de excipientes incluyen uno o más de: celulosa microcristalina y otras celulosas, lactosa, citrato de sodio, carbonato cálcico, fosfato de calcio dibásico, glicina, almidón, azúcar de la leche y polietilenglicoles de alto peso molecular.

Ejemplos de disgregantes incluyen uno o más de: almidón (preferentemente almidón de maíz, patata o tapioca), glicolato sódico de almidón, croscarmelosa sódica y ciertos silicatos complejos.

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

- 5 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.

- 10 Los otros componentes pueden usarse simultáneamente (por ejemplo, cuando están en mezcla juntos o incluso cuando se administran por diferentes vías) o secuencialmente (por ejemplo, pueden administrarse por diferentes vías).

- 15 Como se usa en el presente documento, el término “componente adecuado para consumo animal o humano” significa un compuesto que es o puede añadirse a la composición de la presente invención como un suplemento que puede ser de beneficio nutricional, un sustituto a la fibra, o tener un efecto generalmente beneficioso para el consumidor.

A modo de ejemplo, los componentes pueden ser prebióticos tales como alginato, xantana, pectina, goma de semilla de algarroba (LBG), inulina, goma guar, galacto-oligosacárido (GOS), fructo-oligosacárido (FOS), lacto-sacarosa, oligosacáridos de soja, palatinosa, isomalto-oligosacáridos, gluco-oligosacáridos y xilo-oligosacáridos.

#### **SUSTANCIA DE ALIMENTO O DE PIENSO**

- 20 Los compuestos pueden usarse como, o en la preparación de, una sustancia de alimento o de pienso. Aquí, el término “alimento” se usa en un amplio sentido y cubre alimento y productos alimenticios para seres humanos, además de alimento para animales (es decir, un pienso). El término “pienso” se usa con referencia a productos que se alimentan a animales en la cría de ganado. En un aspecto preferido, el alimento o pienso es para consumo por animales monogástricos tales como cerdo, aves de corral y pescado.

- 25 El alimento o pienso puede estar en forma de una disolución o como un sólido, dependiendo del uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

#### **INGREDIENTES Y SUPLEMENTOS DE ALIMENTO Y PIENSO**

Los compuestos pueden usarse como un ingrediente de alimento o pienso.

- 30 Como se usa en el presente documento, el término “ingrediente de alimento o pienso” incluye una formulación que es o puede añadirse a alimentos o comestibles e incluye formulaciones que pueden usarse a bajos niveles en una amplia variedad de productos.

El ingrediente de alimento puede estar en forma de una disolución o como un sólido, dependiendo del uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

Los compuestos pueden ser, o pueden añadirse a, suplementos de alimentos.

- 35 **ALIMENTOS Y COMPOSICIONES DE PIENSO**

Las composiciones de pienso para animales monogástricos normalmente incluyen composiciones que comprenden productos vegetales que contienen fitato. Tales composiciones incluyen harina de maíz, harina de soja, harina de colza, harina de semilla de algodón, piensos basados en maíz, trigo, cebada y sorgo.

- 40 Las fitasas descritas en el presente documento pueden ser, o pueden añadirse a, alimentos o composiciones de pienso.

- 45 La presente invención también proporciona un procedimiento de preparación de un ingrediente o suplemento de alimento o de pienso, procedimiento que comprende mezclar fitasas producidas mediante el procedimiento de la presente invención o la composición según la presente invención con otro ingrediente de alimento. El procedimiento para preparar un ingrediente de alimento también es otro aspecto de la presente invención. Los procedimientos para preparar pienso animal se han explicado anteriormente. La enzima también puede añadirse en forma de una formulación sólida, o como un aditivo de pienso, tal como una pre-mezcla. Una forma sólida se añade normalmente antes o durante la etapa de mezclado; y una forma líquida se añade normalmente después de la etapa de granulado.

**AGENTES FARMACÉUTICOS** - sólo para referencia

- 5 Las fitasas de la presente descripción también pueden usarse en preparaciones farmacéuticas o para combinación en comestibles con el fin de proporcionar algún efecto farmacéutico. Por ejemplo, el documento 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 bebida para seres humanos.
- Además, el documento EP 1.392.353 describe un medicamento o suplemento nutricional que contiene fitasa que es útil para aumentar la biodisponibilidad de bioelementos, por ejemplo, calcio y hierro, y para combatir enfermedades de deficiencia.
- 10 Aquí, el término “agente farmacéutico” se usa en un amplio sentido y cubre productos farmacéuticos y/o productos nutricéuticos para seres humanos, además de productos farmacéuticos y/o productos nutricéuticos para animales (es decir, aplicaciones veterinarias). En un aspecto preferido, el agente farmacéutico es para uso humano y/o para la industria pecuaria.
- El agente farmacéutico puede ser para fines terapéuticos, que pueden ser de naturaleza curativa o paliativa o preventiva. El agente farmacéutico puede incluso ser para fines de diagnóstico.
- 15 Cuando se usa como, o en la preparación de, un agente farmacéutico, el producto y/o los compuestos de la presente descripción pueden usarse conjuntamente con uno o más de: un vehículo farmacéuticamente aceptable, un diluyente farmacéuticamente aceptable, un excipiente farmacéuticamente aceptable, un adyuvante farmacéuticamente aceptable, un principio farmacéuticamente activo.
- 20 El agente farmacéutico puede estar en forma de una disolución o como un sólido, dependiendo del uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

**COMPONENTE FARMACÉUTICO** - sólo para referencia

- El producto y/o los compuestos de la presente invención pueden usarse como componentes farmacéuticos. Aquí, el producto y/o la composición de la presente invención puede ser el único componente activo o puede ser al menos uno de varios (es decir, 2 o más) componentes activos.
- 25 El componente farmacéutico puede estar en forma de una disolución o como un sólido, dependiendo del uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.
- El componente farmacéutico puede estar en forma de un producto efervescente para mejorar las propiedades de disolución del agente farmacéutico.

**FORMAS**

- 30 El producto y/o los compuestos de la presente invención pueden usarse en cualquier forma adecuada, tanto si están solos como cuando están presentes en una composición. Asimismo, las fitasas producidas según la presente invención (es decir, ingredientes tales como ingredientes de alimentos, ingredientes de alimentos funcionales) pueden usarse en cualquier forma adecuada.
- 35 Ejemplos adecuados de formas incluyen uno o más de: comprimidos, píldoras, cápsulas, óvulos, disoluciones o suspensiones, que pueden contener aromatizantes o colorantes para administraciones inmediatas, retardadas, modificadas, sostenidas, pulsadas o de liberación controlada.
- A modo de ejemplo, si el producto y/o la composición se usan en una forma de comprimido, tal como para su uso en ingrediente funcional, los comprimidos también pueden contener uno o más de: excipientes, disgregantes, aglutinantes de granulación o lubricantes.
- 40 Ejemplos de vehículos nutricionalmente aceptables para su uso en la preparación de las formas incluyen, por ejemplo, agua, disoluciones salinas, alcohol, silicona, ceras, vaselina y similares.
- Excipientes preferidos para las formas incluyen lactosa, almidón, una celulosa, azúcar de la leche o polietilenglicoles de alto peso molecular.
- 45 Para suspensiones acuosas y/o elixires, los compuestos de escisión de carotenoides pueden combinarse con diversos edulcorantes o aromatizantes, materia colorante o colorantes, con emulsionantes y/o agentes de suspensión y con diluyentes tales como agua, etanol, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de los mismos.
- Las formas también pueden incluir cápsulas de gelatina; cápsulas de fibra, comprimidos de fibra, etc.

## TÉCNICAS DE METODOLOGÍA DE ADN RECOMBINANTE GENERALES

La presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología que están dentro de las capacidades de un experto en la materia. 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, Books 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. y col. (1995 y suplementos periódicos; *Current Protocols in Molecular Biology*, Cap. 9, 13 y 16, John Wiley & Sons, New 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.

### EJEMPLOS

La invención se ilustra ahora adicionalmente en los siguientes ejemplos no limitantes.

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

Los ensayos de fitasa se llevaron a cabo en placas de microtitulación. La mezcla de reacción (100 µl) contuvo: fitato 2 mM y CaCl<sub>2</sub> 0,8 mM en tampón acetato sódico 200 mM, pH 3,5. La reacción se dejó que avanzara durante 1 h a 37°C, tiempo después del cual se midió el fosfato liberado por una modificación de un procedimiento conocido (Heinonen J.K., Lahti R.J. *Anal Biochem.* 113 (2), 313-317 (1981)). Brevemente, 200 µl de una disolución de AMM recientemente preparada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7,5 N, molibdato de amonio 15 mM y acetona - 1:1:2) se añadieron a la mezcla de reacción de 100 µl en cada pocillo de la placa de microtitulación. La absorbancia a 390 nm se midió no antes de 10 min y no después de 30 min después de la adición del reactivo de AMM. La cantidad de fosfato se determinó formando una curva de calibrado con disoluciones de fosfato de concentraciones conocidas. Para ensayar la actividad de fitasa a diferentes valores de pH se usaron los siguientes tampones (todos 200 mM): glicina/HCl entre pH 2,0 y 3,0, acetato sódico/ácido acético entre pH 3,5 y 5,5, Tris/ácido maleico entre pH 6,0 y 7,5.

#### Ejemplo 2. Cepa P3-42 productora de fitasa.

La cepa P3-42 bacteriana se aisló originariamente de una masa de hojas de abedul caídas recogidas de un bosque húmedo en el sur de Finlandia. La cepa puede cultivarse aeróbicamente a 30°C en muchos medios simples de cultivo, por ejemplo, medio LB (1% de peptona, 0,5% de extracto de levadura, 1% de NaCl, pH 7,4) o de bajo fosfato PP1 (1% de peptona, 1% de extracto de vacuno, 0,5% de extracto de levadura, CaCl<sub>2</sub> - 0,2 M. El medio se ajusta a pH 11 con NaOH y se hierve durante 10 min. El precipitado se elimina por filtración, el pH se reajusta a 5,5 y el medio se esteriliza en autoclave durante 15 min a 121°C).

Después del crecimiento en medio PP1 líquido se encontró que la cepa presentaba actividad de fitasa tanto a pH 3,5 como a 5,5 (ensayada como se describe en el Ejemplo 1). La relación de actividades a 3,5 y 5,5 fue aproximadamente 1,5. La actividad también se midió por separado en las células y el sobrenadante de cultivo de P3-42. Según estas mediciones, aproximadamente el 90% de toda la actividad de fitasa se encontró en el sobrenadante. La cepa se depositó en NCIMB el 22 de septiembre de 2004 bajo el número de acceso NCIMB 41247.

#### Ejemplo 3. Aislamiento de ADN cromosómico de la cepa P3-42.

Se preparó ADN cromosómico esencialmente mediante el procedimiento convencional (Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, 1996). Un cultivo de 250 ml cultivado durante la noche a 30°C en medio LB se centrifugó a 10.000 rpm durante 30 min, se lavó en 20 ml de Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM a pH 8 y se re-suspendió en 10 ml de TES frío (Tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, 15% de glucosa a pH 8). Se añadió Lysozyme a 10 mg/ml y la suspensión de células se incubó a 37°C durante 30 - 60 min hasta que se produjo la lisis, determinada por dilución de 100 µl de la mezcla de reacción en 1 ml de 1% de SDS y comprobando para una consistencia "viscosa". En ese momento, el SDS y la proteinasa K (Sigma) se añadieron a una concentración final de 1% y 0,5 mg/ml, respectivamente. La mezcla de reacción se incubó durante 30 min a 56°C, seguido de la adición de 2 ml de 5 M NaCl y 1,4 ml de 10% de bromuro de cetiltrimetilamonio (Sigma). La incubación continuó durante 15 min a 65°C. La disolución se extrajo una vez con cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y una vez con fenol/cloroformo. Después de las extracciones, la fase acuosa se mezcló con 0,6 vol de isopropanol, el ADN precipitado se recogió por centrifugación (10.000 rpm, 15 min), se lavó con 70% de etanol, se secó a vacío y se re-suspendió en 2 ml de Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM a pH 8, 5 µg/ml de RNAsa.

#### Ejemplo 4. Identificación taxonómica de la cepa P3-42 bacteriana.

Un fragmento del gen de ARNr 16S de la cepa P3-42 se amplificó por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con *Taq* ADN polimerasa (Roche) usando los cebadores 536f (CAGCMGCCGCGGTAATWC) y 1392r (ACGGGCGGTGTGTRC) (Lane, D. J. en *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, Stackbrandt, E. y Goodfellow, M. eds, John Wiley & Sons, Nueva York: pág. 115-117 (1991)). Se usó el siguiente programa: 1) etapa

de desnaturalización de ADN inicial 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) una etapa de extensión final de 70°C durante 10 min. Los productos de PCR, aproximadamente 900 pares de bases de tamaño, se purificaron por electroforesis en 0,8% de gel de agarosa y se extrajeron del gel usando un kit de purificación por PCR (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. Los productos de PCR purificados se secuenciaron por Medprobe (Noruega) como un servicio comercial. El área secuenciada se enumera como SEC ID N° 1. Esta secuencia se comparó con las secuencias de ADN en la base de datos de GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). El mayor apareamiento (823 de los 824 nucleótidos, 99,9%) se encontró con la secuencia del gen de ARN 16S de DSM 30039 de *Citrobacter freundii*. Por tanto, la cepa P3-42 puede clasificarse taxonómicamente como *Citrobacter freundii*.

#### 10 **Ejemplo 5. Clonación del gen de fitasa de P3-42 de *C. freundii*.**

El ADN cromosómico de la cepa P3-42 de *Citrobacter freundii* se digirió parcialmente con la endonucleasa de restricción *Sau3A* y el digesto se fraccionó sobre 1% de gel de agarosa. Los fragmentos de ADN de 3 a 5 kb se aislaron del gel usando un kit de purificación en gel (Qiagen) y se ligaron con brazos de  $\lambda$ -ZAP desfosforilados digeridos con *Bam*HI (Stratagene). Las etapas posteriores para la construcción de bibliotecas siguieron las instrucciones del kit de clonación Stratagene's ZAP Express Predigested Vector/Gigapack. La forma de fago de la biblioteca se convirtió en una forma de plásmido por el procedimiento de "escisión en masa" como se describe por el fabricante (Stratagene). El cribado de la biblioteca de plásmidos se hizo similarmente a los procedimientos anteriormente publicados para la detección de actividad de fitasa en 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. y col., *J. Appl. Microbiol.* 82, 177-185 (1997)). Se aislaron varios clones positivos para fitasa y se purificaron por subclonación. Estas cepas aisladas se cultivaron en cultivo líquido (medio LB a 30°C y 200 rpm durante aproximadamente 24 h) y la actividad de fitasa (Ejemplo 1) se midió en las suspensiones de células resultantes. Se seleccionó un clon que tuvo la mayor actividad de fitasa (aproximadamente 5 U/ml a pH 3,5) para la posterior caracterización. El ADN de plásmido se aisló de este clon, llamado pBK(P3-42), y se caracterizó por secuenciación de ADN parcial del ADN del inserto (el servicio de secuenciación se obtuvo de Medprobe (Noruega)). Esta secuencia que comprende el gen de fitasa se enumera SEC ID N°: 2. La secuencia de aminoácidos deducida de la fitasa de *C. freundii* se enumera SEC ID N°: 3. La comparación de la SEC ID N°: 3 con las secuencias en GenBank usando el servicio de BLAST proporcionado por NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) identifica la fitasa de *E. coli* como el homólogo conocido más relacionado de la fitasa de *C. freundii*. Sin embargo, el nivel de homología es bajo, sólo aproximadamente el 62% de los residuos de aminoácidos son idénticos en ambas proteínas.

#### 30 **Ejemplo 6. Amplificación y expresión del gen de fitasa de P3-42 de *C. freundii*.**

El gen de fitasa se amplificó por PCR. El ADN cromosómico de la cepa P3-42 de *C. freundii* se usó como molde y los oligonucleótidos o42-5 (GGAATTCATATGAGTACATTCATTCG) y o42-3 (GGAATTCGGATCCCTTATTCGTAACACTGCACAC) como cebadores. La amplificación se llevó a cabo usando el kit Expand High Fidelity PCR System (Roche). Se usó el siguiente programa: 1) desnaturalización de ADN inicial 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 de extensión final de 10 min a 72°C. El producto de PCR resultante se purificó por electroforesis en 0,8% de gel de agarosa seguido de extracción de ADN del gel usando un kit de purificación en gel (Qiagen). El producto de PCR purificado se digirió con las enzimas de restricción *Nde*I y *Bam*HI y se aisló de la mezcla de reacción por el kit de purificación de PCR (Qiagen). El vector de plásmido pET11a (Novagen) se digirió con las endonucleasas de restricción *Nde*I y *Bam*HI, se des-fosforiló usando fosfatasa alcalina de gamba (Roche) y se purificó por electroforesis en 0,8% de gel de agarosa. La banda de ADN de plásmido linealizado se escindió del gel y se purificó usando un kit de purificación en gel (Qiagen). Los dos fragmentos de ADN purificados se ligaron usando T4 ADN ligasa (Roche). La reacción de ligación se precipitó con 70% de etanol, se lavó con etanol y se re-suspendió directamente en 50  $\mu$ l 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 usando un Gene Pulser Xcell (BioRad) fijado a 1800 V, 25  $\mu$ F y 200  $\Omega$ . Inmediatamente después de la electroporación se añadió 1 ml de medio LB, la suspensión de células se transfirió a un tubo de plástico de 15 ml (Falcon) y se incubó a 37°C con agitación (200 rpm) durante 1 h. Las células transformadas se sembraron sobre placas LB que contenían 100  $\mu$ g/ml de ampicilina y se incubaron durante la noche a 37°C. 24 transformantes se cultivaron en cultivo líquido y los cultivos se usaron para ensayar la actividad de fitasa y el aislamiento de ADN de plásmido. Se seleccionó un clon que produjo la mayor actividad de fitasa y que generó el patrón de restricción esperado del ADN de plásmido. El plásmido contenido por este clon llamado pET11(P3-42) se usó para transformar la cepa huésped de expresión BL21(DE3)pLysS (Novagen). La suspensión de células transformada se agitó durante 1 h a 37°C en LB que contenía 2% de glucosa y se inoculó en 50 ml de LB que contenía ampicilina (100  $\mu$ g/ml) y glucosa (2%) y se cultivó durante la noche a 30°C con agitación (200 rpm). La DO del cultivo resultante se midió a 600 nm y el cultivo se usó para inocular 1 l de LB + ampicilina (100  $\mu$ g/ml) a una DO<sub>600</sub> de 0,04. El crecimiento continuó durante la noche a 30°C. La actividad de fitasa en tales cultivos fue normalmente 50-60 U/ml (medida a pH 3,5). Casi toda la fitasa se secretó en el medio de cultivo. El hecho de que la fitasa de *C. freundii* sea una enzima eficientemente secretada tanto en su huésped nativo como durante la expresión heteróloga en *E. coli* es una diferencia de la naturaleza intracelular de una fitasa de *C. brakii* (Kim H.W. y col. *Biotechnol. Lett.* 25, 1231-1234 (2003)). La actividad en el cultivo de una cepa de control BL21(DE3)pLysS

transformada con pET11 cultivada bajo las mismas condiciones fue inferior a 0,05 U/ml.

#### **Ejemplo 7. Purificación de la fitasa recombinante de P3-42 de *C. freundii*.**

El cultivo de BL21(DE3)pLysS transformado con pET11(P3-42) se centrifugó para eliminar las células bacterianas, se concentró usando un evaporador rotatorio a aproximadamente 1/10 del volumen original y se dializó contra agua hasta que la conductividad de la disolución disminuyó por debajo de 250  $\mu$ S/cm. El pH de la disolución se ajustó a 8,0 con base de Tris y se aplicó a una columna (3 x 20 cm) de DEAE Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences) equilibrada con Tris-HCl 25 mM, pH 8,0. La columna se lavó con el tampón de equilibrio a una velocidad de flujo de 3 ml/min durante 30 min, seguido de elución con tres gradientes sucesivos de NaCl en Tris-HCl 25 mM, pH 8,0: 0-50 mM, 50-150 mM y 150-500 mM. Cada uno de los tres gradientes se programó durante 1 h con una velocidad de flujo constante de 3 ml/min. Se recogieron fracciones de 9 ml y se ensayaron para actividad de fitasa. Se detectó un pico fuerte de actividad. La proteína en la fracción de pico se concentró usando concentradores Centriplus (Amicon) y se analizó por SDS-PAGE usando un 12% de gel y el sistema de tapón Laemmli convencional. Los resultados de este análisis indican que la preparación de fitasa P3-42 de *C. freundii* recombinante obtenida por DEAE Sepharose contiene un único componente de proteína prominente. Los análisis semi-cuantitativos basados en el barrido de la imagen digital del gel (Fig. 1) indican la pureza de aproximadamente el 60-70%.

#### **Ejemplo 8. Perfil de pH de la fitasa recombinante de P3-42 de *C. freundii*.**

Se estudió la dependencia de la actividad de la fitasa de P3-42 de *C. freundii* (purificada según el Ejemplo 7) del pH en tampones y en condiciones descritas en el Ejemplo 1. La enzima fue activa en una amplia área de pH (2-5,5) con dos máximos de actividad de aproximadamente pH 3 y 4 - 4,5 (Fig. 2).

#### **Ejemplo 9. Especificidad de sustrato de la fitasa recombinante de P3-42 de *C. freundii*.**

Las fracciones de fosfatos de inositol que contienen tres, cuatro o cinco fosfatos por residuo de inositol se aislaron por cromatografía de intercambio iónico a partir de un hidrolizado parcial del ácido fítico tratado con fitasa fúngica (Natuphos). La producción y purificación de estas preparaciones fue un servicio comercial de BioChemis Ltd (San Petersburgo, Rusia). La contaminación de cada fracción con fosfatos de inositol que tienen un grado de fosforilación diferente fue inferior al 5% como se juzga por HPLC (Sandberg A.S., Ahderinne R. J. Food Sci. 51 (3), 547-550). El 1,6-difosfato de fructosa y el 6-fosfato de fructosa (Sigma) comerciales se usaron como sustratos modelo para estimar la especificidad de la fitasa de P3-42 de *C. freundii* hacia sustratos de di- y monofosfato. La actividad de la fitasa de *C. freundii* purificada según el Ejemplo 7 con diferentes sustratos se midió por el ensayo convencional (Ejemplo 1) a pH 3,5 usando concentraciones 2 mM de sustratos en la mezcla de reacción final. Los resultados (Fig. 3) indican que la enzima tiene máxima actividad con pentafofosfato de inositol. Las actividades con tri- y tetrafosfatos de inositol, además del ácido fítico, fueron bastante similares mientras que el 1,6-difosfato de fructosa fue un sustrato bastante malo. La hidrólisis de 6-fosfato de fructosa estuvo por debajo del límite de detección fidedigno.

#### **Ejemplo 10. Actividad específica de la fitasa recombinante de P3-42 de *C. freundii*.**

La actividad específica de la fitasa de *C. freundii* se estimó usando la preparación purificada según el Ejemplo 7. La actividad de fitasa se midió a pH 3,5 según el Ejemplo 1. La concentración de fitasa se calculó midiendo la concentración total de proteína con el kit de ensayo de proteínas BCA (Pierce) y corrigiéndolo por el contenido de fitasa estimado por SDS-PAGE (Ejemplo 7). Según estas mediciones, la actividad específica de la fitasa recombinante de P3-42 de *C. freundii* es aproximadamente 1100 U/mg.

#### **Ejemplo 11. Comparación de fitasa de P3-42 de *C. freundii* con la fitasa de YH-15 de *C. brakii*.**

La única fitasa de una bacteria que pertenece a la familia *Citrobacter* descrita anteriormente es la fitasa intracelular de YH-15 de *C. brakii* (Kim H.W. y col. Biotechnol. Lett. 25, 1231-1234 (2003)). Esta enzima comparte algunas propiedades con la fitasa secretada de *C. freundii* de la presente invención ya que ambas enzimas son fitasas ácidas de alta actividad específica. La comparación directa de las secuencias de aminoácidos de las dos enzimas es imposible debido a que la información de secuencias referente a la enzima de *C. brakii* está limitada a un estiramiento de 10 residuos de aminoácidos. La secuencia deducida de aminoácidos de la fitasa de *C. freundii* contiene un fragmento que comparte 9 de los 10 residuos con la secuencia de enzimas de *C. brakii*. Sin embargo, la comparación de tales fragmentos de secuencia cortos no permite ninguna conclusión sobre la homología global de las dos enzimas que van a prepararse. La diferencia más sorprendente entre las dos enzimas está en la localización celular: mientras que la enzima de *C. brakii* es intracelular, la fitasa de *C. freundii* es claramente una enzima secretada. La enzima es secretada en su huésped nativo, su secuencia de aminoácidos deducida no contiene un péptido señal (como se predice por el algoritmo Signal P: <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), la enzima también se secreta muy eficientemente de *E. coli* bajo su péptido señal nativo. Además de esto, hay varias diferencias significativas en las propiedades bioquímicas de las dos enzimas (Tabla 1). Tabla 1

**Comparación de la fitasa de P3-42 de *C. freundii* con la fitasa de YH-15 de *C. brakii*.**

Propiedad	Fitasa de YH-15 de <i>C. brakii</i>	Fitasa de P3-42 de <i>C. freundii</i>
Localización	Intracelular	Secretada
Actividad específica	3457 U/mg (pH 4)	1100 U/mg (pH 3,5)
pH óptimo	4,0	3,0, 5,0
Termoestabilidad	20% <sup>(*)</sup>	58%
(*) Medida en condiciones descritas por Kim y col. (Biotechnol. Lett. 25, 1231-1234 (2003)); tratamiento por calentamiento en acetato de Na 100 mM, pH 4, 60°C, 30 min seguido de ensayo convencional a 37°C.		

**Ejemplo 12. Generación y caracterización de variantes de fitasa.**

5 Se construyeron variantes de fitasa por mutagénesis de la secuencia SEC ID N° 2 usando procedimientos de mutagénesis como se han enumerado anteriormente tal como los procedimientos desvelados en Morinaga y col. (Biotechnology (1984) 2, p 646-649), o en Nelson y Long (Analytical Biochemistry (1989), 180, pág. 147-151), o el protocolo de mutagénesis de umbral de error descrito en el documento WO 92/18645.

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

**1. Termoestabilidad**

10 La termoestabilidad de las variantes se caracterizó por la temperatura de inactivación de la enzima. La temperatura de inactivación se determinó midiendo la actividad residual de la enzima en un ensayo de enzima como se describe en el Ejemplo 1 después de la incubación durante 10 min a diferentes temperaturas y posterior enfriamiento hasta temperatura ambiente. La temperatura de inactivación es la temperatura a la que la actividad residual es el 50% en comparación con la actividad residual después de la incubación durante la misma duración bajo las mismas condiciones a temperatura ambiente. Cuando corresponda se hacen interpolaciones y extrapolaciones de los datos de actividad medidos con el fin de determinar la temperatura correspondiente al 50% de actividad residual. Las diferencias de termoestabilidad en °C se calcularon restando las temperaturas de inactivación de dos enzimas entre sí (es decir, la diferencia de termoestabilidad (D.T.) se compara con la fitasa parental (=temperatura de inactivación (variante) - temperatura de inactivación (parental)). La Tabla 2 enumera las diferencias de termoestabilidad para diferentes variantes:

20 TABLA 2: Diferencias de termoestabilidad para variantes derivadas de la fitasa parental P3-42 que tiene la secuencia mostrada en SEC ID N° 3.

Variante	D.T.
P229S	1,5
D112V	1,5
Q82R	1,5
Q274H	1,0
D112Y	2,5
F88Y	1,5
K46E	2,0
S233C	2,0
R288M	4,0
I384L	1,0
Q385R	1,5
Q274L	2,0

ES 2 394 908 T3

<b>Variante</b>	<b>D.T.</b>
E307Y	1,0
T199I	2,0
Q82K	2,0
T203I	1,0
K46E/Q82H	2,5
Q82K/V105I	1,0
N148D/T362I	1,5
K46E/L414I	1,0
F88Y/Y136N	1,0
N95P/N96S	1,5
N95P/N96P	2,0
Q97T/T98G	1,0
Y177F/T199I	2,5
Q274L/Q370H	3,0
K46E/N96Y	2,5
N148D/L301S	1,5
E24D/R288M	1,5
E140V/A322V	2,0
K46E/S195T	2,0
E75K/N365D	1,5
T98P/S235A	2,0
L160F/L215F	1,0
Q274L/K395T	1,5
G67R/Q279E/N308T	2,0
K161N/P229S/R288M	2,0
D53N/D57Y/M152V	2,0
F122Y/S156T/P229S	1,5
E23K/K46E/Q82H	6,0
K46E/Q82H/Q385R	5,0
T203W/E204N/K205R	2,0
T203W/E204H/K205R	3,0
T203W/E204R/K205R	3,0
T203W/E204A/K205R	3,0

ES 2 394 908 T3

Variante	D.T.
A22T/K151G/N308D	2,0
E23K/E75K/F88Y	2,0
M152K/N225D/L301S	2,0
S78T/Q274L/S408I	2,0
L176Q/T199I/T366S	1,5
K46E/V77I/T203S	3,0
K46R/T199I/D367N	1,5
G74R/E204G/R288M	1,5
A22T/T199I/S206T/T207A	1,5
Q82R/F88Y/L126I/I384L	3,0
K46E/Q82H/E168D/Q274L	5,0
Q82K/T154I/Q279E/N308T	5,5
Q82R/D112V/Q274H/T362A	5,0
E24D/E79V/N95D/K360N	1,0
E23K/M28L/A109T/T143P/I384L	2,0
D53N/D57Y/T199I/P229S/R288M	6,0
K46E/Q82H/N148D/T154I/T362I	7,0
D53N/D57Y/P229S/R288M/K358R	5,5
D53N/D57Y/T154I/P229S/R288M	7,0
Y136N/T199I/T203L/E204I/K205P	3,0
E23Q/S101F/Q274L/I384M/K391N	2,0
K46E/Q82H/N95D/D112V/K142R/D383V	5,5
D53N/D57Y/M152V/P229S/R288M/A393P	7,0
D53K/D57Y/M152V/P229S/R288M/A393P	8,0
D53N/D57Y/F88Y/M152V/P229S/Q279E/N308T	6,5
D53N/D57Y/M152V/E204V/P229S/R288M/A393P	8,0
D53N/D57Y/M152V/T154I/P229S/R288M/A393P	8,0
D53N/D57Y/Q82H/G103E/M152V/P229S/R288M/A393P	8,5
K46E/D53N/D57Y/T143I/M152V/L176V/P229S/R288M/A393P	8,0
Q82K/F88Y/N96P/Q97T/T98G/V105I/Q274H/Q279E/A393P	9,0
Q82R/F88Y/N95P/N96P/Q97T/Q279E/IP386L/P386Q/A393P	9,0
D53N/D57Y/E75V/M152V/A170T/P229S/R288M/Q385R/A393P	7,5
Q82K/F88Y/N96P/T98G/Y136N/B4152V/Y177F/T362I/I384F/A393P/D397N	10,0

Variante	D.T.
D53N/D57Y/F88Y/N95P/N96P/V105I/D112V/Y136N/N148D/N164D/Q274 H/T362I/I384L/A393P	10,0
D53N/D57Y/Q82K/F88Y/N95P/P102L/V105I/Y136N/N148D/Y177F/Q274 H/Q279E/T362I/A393P	10,0
D53N/D57Y/Q82K/F88Y/N96P/T98G/V105I/D112V/Y177F/Q274L/G343A /T362I/I384L/A393P	9,0

**2. Otras características**

También se mejoraron otras características.

- 5 La termoestabilidad, actividad específica y estabilidad de pepsina de variantes seleccionadas se compararon usando ensayos como se ha descrito anteriormente. La estabilidad de pepsina de tales variantes se caracterizó por actividades residuales medidas a pH 3,5, 37°C, después de la incubación de pepsina en comparación con condiciones de control (actividad residual = actividad después de la incubación de pepsina / actividad después de la incubación bajo condiciones de control). La incubación de pepsina se realizó durante 2 horas a pH 2,0, 0,25 mg/ml de pepsina, CaCl<sub>2</sub> 1 mM y 5 mg/ml de BSA a 37°C. Las condiciones de control fueron 2 horas a pH 5,0, CaCl<sub>2</sub> 1 mM y 5 mg/ml de BSA a 37°C.
- 10 La Tabla 3 muestra propiedades de variantes seleccionadas (derivadas de y en comparación con el peso de fitasa según SEC ID N°. 3).

Variante	D.T. [°C]	Actividad específica [% de peso de actividad]	Estabilidad de pepsina [% de actividad residual (peso = 41 %)]
<b>K46E/ Q82H</b>	2,2	96	65

**INFORMACIÓN DE SECUENCIAS**

SEC ID N°: 1

- 15
- ```

CGATTACTAGCGATTCCGACTTCTGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCG
GACTACGACATACTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTGGCTTCTC
TTTGTATATGCCATTGTAGCAGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATG
ATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCCTCCAGTTTATCAC'GGCAGTCTCC
TTTGAGTTC'CCCGCCGAACCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCG
TTGCGGGACTTAACCCCAACATTTCAACAACGAGCTGACGACAGCCATGC
AGCACCTGTCTCAGAGTTC'CCGAAGGCACCAAAGCATCTCTGCTAAGTTC
TCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACC
ACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAAC
CTTGCGGCCGTA'CTCCCCAGGCGGTGACTTAAAGCGTTAGCTCCGGAAG
CCACGCCTCAAGGGCACAACCTCCAAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGAC
TACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGTTTTCGCACCTGAGCGT
CAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCTCCAGATCTC
TACGCATTCACCGCTACACCTGGAATTCACCC'CCCTCTACAAGACTCT
AGCCTGCCAGTTTCCGATGCAGTTC'CCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACA
TCCGACTTGACAGACCGCCTGCGTGCGCTTACGCCAGTAATTCCGATT
AACGCTTGCACCC'CTCCGTATTAC
    
```

SEC ID N° 2:

AAAGGTGGTGCTGGTAATGAGTACATTCATCATTGTTTTATTATTTTTTTT  
CTCTCTTATGCGGTTCTTTCTCAATACATGCTGAAGAGCCGAACGGTATG  
AAACTTGAGCGGGTTGTGATAGTGAGCCGTCATGGAGTAAGAGCACCTAC  
GAAGTTCACTCCAATAATGAAAGATGTTACACCCGATCAATGGCCACAAT  
GGGATGTGCCGTTAGGATGGCTAACGCCTCGTGGGGGAGAACTTGTTTCT  
GAATTAGGTCAGTATCAACGTTTATGGTTCACAAGCAAAGGTCTGTTGAA  
TAATCAAACGTGCCCATCTCCAGGGCAGGTTGCTGTTATTGCAGACACGG  
ATCAACGCACCCGTAAAACGGGTGAGGCGTTTCTGGCTGGGTAGCACCA  
AAATGTCAAATTCAAGTGCATTATCAGAAGGATGAAGAAAAAACTGATCC  
TCTTTTTAATCCAGTAAAAATGGGGACATGTTTCGTTTAAACATTGAAGG  
TTAAAAACGCTATTCTGGAACGGGCCGGAGGAAATATTGAACTGTATAACC  
CAACGCTATCAATCTTCATTTCCGACCCCTGGAAAATGTTTTAAATTTCTC  
ACAATCGGAGACATGTAAGACTACAGAAAAGTCTACGAAATGCACATTAC  
CAGAGGCTTTACCGTCTGAACTTAAGGTAACCTCTGACAATGTATCATT  
CCTGGTGCCTGGAGTCTTTCTCCACGCTGACTGAGATATTTCTGTTGCA  
AGAGGCCCAGGGAATGCCACAGGTAGCCTGGGGCGTATTACGGGAGAAA  
AAGAATGGAGAGATTTGFTAAGTCTGCATAACGCTCAGTTTGATCTTTTG  
CAAAGAACTCCAGAAGTTGCCCGTAGTAGGGCCACACCATTACTCGATAT  
GATAGACACTGCATTATTGACAAATGGTACAACAGAAAACAGGTATGGCA  
TAAATTACCCGTATCTCTGTTGTTTATTGCTGGTCATGATACCAATCTT  
GCAAAATTAAGCGGGGCTTTAGATCTTAACTGGTGCCTGCCCGGTCAACC  
CGATAATACCCCTCCTGGTGGGGAGCTTGTATTCGAAAAGTGGAAAAGAA  
CCAGTGATAATACGGATTGGGTTGAGGTTTCATTTGTTTATCAGACGCTG  
AGAGATATGAGGGATATAACAACCGTTGTCGTTAGAAAAACCTGCCGGCAA  
AGTTGATTTAAATTAATTGCATGTGAAGAGAAAAATAGTCAGGGAATGT  
GTTTCGTTAAAAAGTTTTCCAGGCTCATTAGGAAATTCGCGTGCCAGAG  
TGTGCAGTTACGGAATAAGTAACATAACTATATATAGCGTATTAAAAA  
ATAGAAACCCCGGTTTGTAGTCGGGGGTATTCGTATTGTTTATAATTAC

A

SEC ID N° 3:

MSTFIIRLLFFSLLCGSFSIHAEEPNGMKLERVVIVSRHGVRAPTKFTPI  
MKDVTPDQWPQWDVPLGWLT PRGGELVSELGQYQRLWFTSKGLLNNQTCP  
SPGQVAVIADTDQRTRKTGEAFLAGLAPKCQIQVHYQKDEEKTDPLFNPV  
KMGTC SFNTLKVKNAILERAGNIELYTQRYQSSFRTLENVLNFSSQSETC  
KTEKSTKCTLPEALPSELKVTPDNVSLPGAWSLSSTLTEIFLLQEAQGM  
PQVAWGRI TGEKEWRDLLSLHNAQFDLLQRTPEVARSRATPLLDMITAL  
LTNGTTENRYGIKLPVSLLF IAGHDTNLANLSGALDLNWSLPGQPDNTPP  
GGELVF EKWKRTSDNTDQVQSFVYQTLRDMRDIQPLSLEKPAQKVDLKL  
IACEEKNSQGMCSLKSFSRLIKEIRVPECAVTE

Aunque la invención se ha descrito a propósito de realizaciones preferidas específicas, debe entenderse que la invención como se reivindica no debe limitarse excesivamente a tales realizaciones específicas. De hecho, diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son obvios para aquellos expertos en la biología molecular o campos relacionados pretenden estar dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

5

## REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de fitasa aislado que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEC ID N°: 3 correspondiente a fitasa de *Citrobacter freundii* o una secuencia que tiene al menos el 90% de identidad (homología) con la misma; en el que dicho polipéptido comprende una combinación de mutaciones seleccionada del grupo que consiste en: R288M; K46E/Q82H/E168D/Q274L; Q82K/T154I/Q279E/N308T; Q82R/D112V/Q274H/T362A; D53N/D57Y/T199I/P229S/R288M; K46E/Q82H/N148D/T154I/T362I; D53N/D57Y/P229S/R288M/K358R; D53N/D57Y/T154I/P229S/R288M; K46E/Q82H/N95D/D112V/K142R/D383V; D53N/D57Y/M152V/P229S/R288M/A393P; D53K/D57Y/M152V/P229S/R288M/A393P; D53N/D57Y/F88Y/M152V/P229S/Q279E/N308T; D53N/D57Y/M152V/E204V/P229S/R288M/A393P; D53N/D57Y/M152V/T154I/P229S/R288M/A393P; D53N/D57Y/Q82H/G103E/M152V/P229S/R288M/A393P; K46E/D53N/D57Y/T143I/M152V/L176V/P229S/R288M/A393P; Q82K/F88Y/N96P/Q97T/T98G/V105I/Q274H/Q279E/A393P; Q82R/F88Y/N95P/N96P/Q97T/Q279E/I384L/P386Q/A393P; H18Q/D53N/D57Y/E75V/M152V/A170T/P229S/R288M/Q385R/A393P; Q82K/F88Y/N96P/T98G/Y136N/M152V/Y177F/T362I/I384F/A393P/D397N; D53N/D57Y/F88Y/N95P/N96P/V105I/D112V/Y136N/N148D/N164D/Q274H/T362I/I384L/A393P; D53N/D57Y/Q82K/F88Y/N95P/P102L/V105I/Y136N/N148D/Y177F/Q274H/Q279E/T362I/A393P; D53N/D57Y/Q82K/F88Y/N96P/T98G/V105I/D112V/Y177F/Q274L/G343A/T362I/I384L/A393P; E23K/K46E/Q82H; K46E/Q82H/Q385R; D53N/D57Y/E75V/M152V/A170T/P229S/R288M/Q385R/A393P;
- 5
- 10
- 15
- 20 numeradas según la numeración en SEC ID N°. 3, y en el que el polipéptido aislado tiene elevada termoestabilidad en comparación con un polipéptido que tiene la secuencia explicada en SEC ID N°. 3.
2. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido según la reivindicación 1.
- 25 3. Una molécula de ácido nucleico aislada según la reivindicación 2 que codifica el polipéptido aislado o fitasa según la reivindicación 1.
4. Un plásmido o sistema de vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido aislado o fitasa según la reivindicación 1.
5. Un plásmido o sistema de vector según la reivindicación 4 que comprende una secuencia de ácidos nucleicos según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3.
- 30 6. Un plásmido o sistema de vector según las reivindicaciones 4 ó 5 en el que dicho plásmido o sistema de vector es un vector de expresión para la expresión del polipéptido aislado o enzima fitasa en una célula huésped o un microorganismo.
7. Una célula huésped transformada o transfectada con un plásmido o sistema de vector según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6.
- 35 8. Una célula huésped según la reivindicación 7 en el que dicha célula huésped se deriva de un microorganismo que incluye bacterias tales como *B. subtilis*, *E. coli* y hongos que incluyen levadura tal como *H. polymorpha*, *S. pombe*, *S. cerevisiae*.
9. Una célula huésped según la reivindicación 8, en el que dicho microorganismo es una célula bacteriana procariota y preferentemente *E. coli*.
- 40 10. Un procedimiento de producción de una fitasa que comprende expresar una secuencia de aminoácidos como se explica en SEC ID N°: 3, o una secuencia que tiene al menos el 90% de homología con la misma, en una célula huésped y separar la fitasa del medio de cultivo de células huésped, en el que dichas secuencias de aminoácidos comprenden una mutación seleccionada del grupo explicado en la reivindicación 1 o una combinación de mutaciones seleccionada del grupo explicado en la reivindicación 1 y en el que la fitasa tiene elevada termoestabilidad en comparación con un polipéptido que tiene la secuencia explicada en SEC ID N°: 3.
- 45 11. Una composición de alimento o de pienso animal que comprende un polipéptido como se define en la reivindicación 1.
12. Uso de un polipéptido o fitasa según la reivindicación 11 en alimento o pienso animal.
- 50 13. Un procedimiento para la producción de alimento o pienso animal que comprende una etapa de pulverizar un polipéptido o fitasa según la reivindicación 11 en forma líquida sobre dicho alimento o pienso animal, y/o que comprende una etapa de mezclar el polipéptido o fitasa según la reivindicación 11 como producto seco con dicho alimento o pienso animal.

14. Un procedimiento de cribado de una variante de enzima fitasa, procedimiento que comprende:
- 5 a) seleccionar una enzima fitasa parental, en el que la enzima fitasa parental es una enzima fitasa parental con al menos el 90% de homología con SEC ID N° 3;
- b) hacer al menos una alteración en la enzima fitasa parental para obtener una variante de enzima fitasa según la reivindicación 1; y
- c) cribar una variante de enzima fitasa que en comparación con la enzima fitasa parental tiene mayor estabilidad térmica y:
- 10 i. mayor actividad específica; y/o
- ii. mayor estabilidad proteolítica.
15. Un procedimiento de cribado de una variante de enzima fitasa, procedimiento que comprende:
- a) someter la secuencia de ADN que codifica una enzima fitasa parental a mutagénesis para obtener una variante de enzima fitasa según la reivindicación 1, en el que la enzima fitasa parental es una enzima fitasa parental con al menos el 90% de homología con SEC ID N° 3;
- 15 b) expresar la secuencia de ADN mutada obtenida en la etapa a) en una célula huésped; y
- c) cribar células huésped que expresan una variante de enzima fitasa que en comparación con la enzima fitasa parental tiene mayor estabilidad térmica y:
- i. mayor actividad específica; y/o
- ii. mayor estabilidad proteolítica.
- 20 16. Un procedimiento de preparación de una variante de enzima fitasa, procedimiento que comprende:
- a) seleccionar una enzima fitasa parental, en el que la enzima fitasa parental es una enzima fitasa parental con al menos el 90% de homología con SEC ID N° 3;
- b) hacer al menos una alteración en la enzima fitasa parental para obtener una variante de enzima fitasa según la reivindicación 1; y
- 25 c) preparar la variante de enzima fitasa.
17. Un procedimiento de preparación de una variante de enzima fitasa, procedimiento que comprende:
- a) someter la secuencia de ADN que codifica una enzima fitasa parental a mutagénesis para obtener una variante de enzima fitasa según la reivindicación 1, en el que la enzima fitasa parental es una enzima fitasa parental con al menos el 90% de homología con SEC ID N° 3;
- 30 b) expresar la secuencia de ADN mutada obtenida en la etapa a) en una célula huésped; y
- c) preparar la variante de enzima fitasa expresada por la célula huésped.
18. Un polipéptido de fitasa aislado según la reivindicación 1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tienen al menos el 95% de identidad (homología) con SEC ID N°: 3.
- 35 19. Un polipéptido de fitasa aislado según la reivindicación 1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tienen al menos el 96% de identidad (homología) con SEC ID N°: 3.
20. Un polipéptido de fitasa aislado según la reivindicación 1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tienen al menos el 97% de identidad (homología) con SEC ID N°: 3.
- 40 21. Un polipéptido de fitasa aislado según la reivindicación 1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tienen al menos el 98% de identidad (homología) con SEC ID N°: 3.
22. Un polipéptido de fitasa aislado según la reivindicación 1 que comprende una secuencia de aminoácidos que tienen al menos el 99% de identidad (homología) con SEC ID N°: 3.

Figura 1

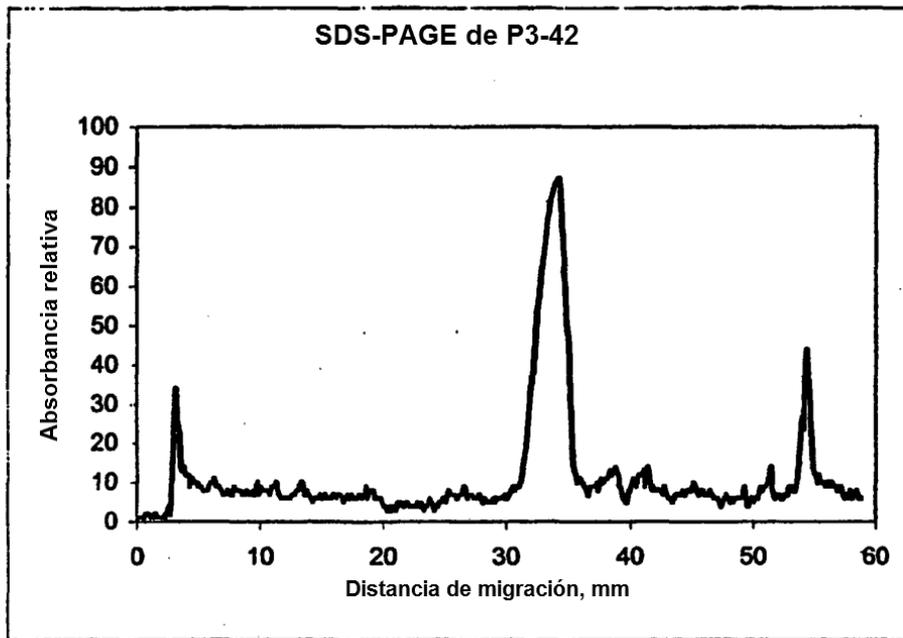


Figura 2

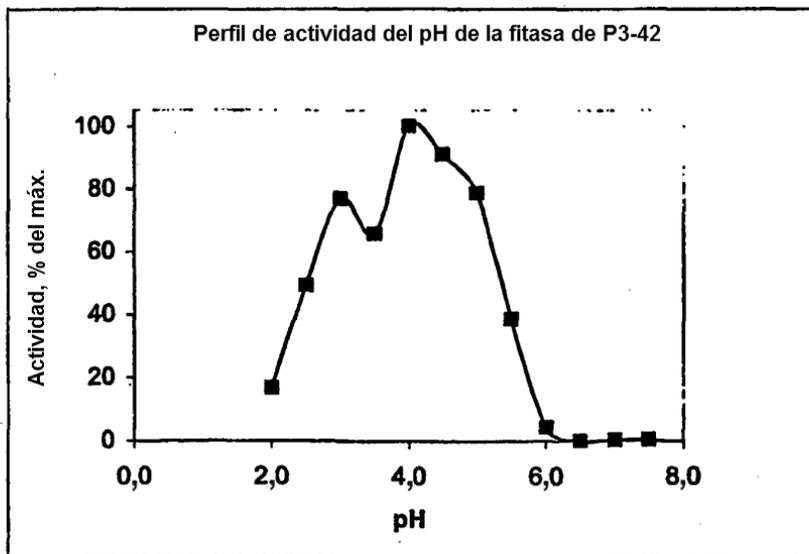


Figura 3

