

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 828**

51 Int. Cl.:

C12N 9/14 (2006.01)

A23K 1/165 (2006.01)

C12N 15/55 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2005 E 05789093 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2012 EP 1799818**

54 Título: **Polipéptidos con actividad de fitasa y polinucleótidos que los codifican**

30 Prioridad:

04.10.2004 DK 200401513

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

12.04.2013

73 Titular/es:

**NOVOZYMES A/S (100.0%)
KROGSHOEJVEJ 36
2880 BAGSVAERD, DK**

72 Inventor/es:

**TAKAMIYA, MONICA;
SJØHOLM, CARSTEN;
FRISNER, HENRIK;
NØRGAARD, ALLAN y
SØRENSEN, MIKAEL, BLOM**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 400 828 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

Polipéptidos con actividad de fitasa y polinucleótidos que los codifican

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 [0001] La presente invención se refiere a polipéptidos aislados con actividad de fitasa y polinucleótidos aislados que codifican los polipéptidos. Los polipéptidos están relacionados con una fitasa derivada de *Citrobacter braakii*, cuya secuencia de aminoácidos se muestra en el listado de secuencias anexo como SEQ ID n°: 4. La invención también se refiere a constructos de ácido nucleico, vectores y células huésped que incluyen los polinucleótidos, así como a métodos para producir y usar los polipéptidos, en particular en alimentos para animales.

15 Descripción de las técnicas relacionadas

[0002] Las fitasas son enzimas bien conocidas, como lo son las ventajas de añadirlas a productos alimenticios para animales, incluidos seres humanos. Las fitasas se han aislado de muchas fuentes, incluidas varias cepas fúngicas y bacterianas.

20 [0003] La fosfatasa ácida de histidina appA de *Escherichia coli* al igual que otras fitasas bacterianas gram-negativas se conocen por tener una alta actividad específica.

25 [0004] El gen que codifica una fitasa (phyA) de *Citrobacter freundii* se describe en Zinin *et al.*, (*Citrobacter freundii* phyA gene, complete cds, EMBL, 1 September 2004, XP002339845). La fitasa deducida es similar a la SEQ ID n°: 2 y 4 de la presente. No se aportan indicaciones de ninguna propiedad.

30 [0005] La producción por *Citrobacter braakii* YH-15 de una fitasa intracelular se proporciona por Kim *et al.* en Biotechnology Letters 25: 1231-1234, 2003. La KR-2004-A-045267 y la WO-2004/085638 revelan, como SEQ ID n°: 7, la secuencia de aminoácidos de una fitasa de *Citrobacter braakii* YH-15, depositada como KCCM 10427. Esta secuencia de aminoácidos se incluye aquí como SEQ ID n°: 5. La WO-2004/085638 fue publicada el 07.10.2004, es decir después de la primera fecha de prioridad de la presente solicitud.

35 [0006] Un objeto de la presente invención es proporcionar polipéptidos alternativos con actividad de fitasa y polinucleótidos que codifiquen los polipéptidos. Los polipéptidos de la invención preferiblemente son de propiedades enmendadas, más preferiblemente mejoradas, por ejemplo de una especificidad de sustrato diferente, de una actividad específica más alta, de una estabilidad aumentada (tal como estabilidad al ácido, estabilidad térmica, y/o estabilidad de proteasa, en particular estabilidad de pepsina), de un pH óptimo enmendado (tal como un pH óptimo más bajo o más alto) y/o de un rendimiento mejorado en el alimento para animales (tal como una liberación y/o degradación mejorada de fitato).

40 Resumen de la invención

45 [0007] La presente invención se refiere a polipéptidos con actividad de fitasa y que incluyen una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 98,8% de identidad con los aminoácidos del 1 al 411 de SEQ ID n°: 2, donde la identidad se determina mediante el programa "Align" usando la matriz de puntuación por defecto BLOSUM50, la penalización para el primer residuo en un espacio es -12 mientras que la penalización para los demás residuos en un espacio es -2, y donde la fitasa tiene una actividad residual tras la incubación a 37°C y en un tampón de 0,1 M de glicina/HCl pH 2,0 durante 4 horas de al menos 20%.

50 [0008] La invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican un polipéptido con actividad de fitasa, seleccionado del grupo que consiste en:

(a) un polinucleótido que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 98,8% de identidad con los aminoácidos 1 a 411 de SEQ ID n°: 2; donde la identidad se determina por el programa "Align" usando la matriz de puntuación por defecto BLOSUM50, la penalización para el primer residuo en un espacio es -12 mientras que la penalización para residuos adicionales en un espacio es -2, y

55 (b) un polinucleótido con un mínimo de 98,5% de identidad con los nucleótidos del 67 al 1299 de SEQ ID n°: 1, donde la identidad se determina mediante el programa "Align" usando la matriz de puntuación por defecto, la penalización para el primer nucleótido en un espacio es -16, mientras que la penalización para nucleótidos adicionales en un espacio es -4, y

60 donde la fitasa codificada tiene una actividad residual tras la incubación a 37°C y en un tampón de 0,1 M de glicina/HCl pH 2,0 durante 4 horas de al menos el 20%.

65 [0009] La invención también se refiere a constructos de ácido nucleico, vectores de expresión recombinantes y células huésped recombinantes que incluyen los polinucleótidos.

[0010] La invención también se refiere a métodos para producir tales polipéptidos con actividad de fitasa incluyendo: (a) el cultivo de una célula huésped recombinante que comprende un constructo de ácido nucleico que incluye un polinucleótido que codifica el polipéptido bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) la recuperación del polipéptido.

[0011] La invención también se refiere a métodos para el uso de los polipéptidos de la invención en alimentos para animales, al igual que en composiciones de alimentos para animales y aditivos para alimentos para animales que contienen los polipéptidos.

[0012] También se describe un constructo de ácido nucleico que comprende un gen que codifica una proteína operativamente enlazada a una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal que consiste en: (i) los nucleótidos del 1 al 66 de SEQ ID n°: 1 o (ii) los nucleótidos del 1 al 66 de SEQ ID n°: 3 donde el gen es foráneo de la secuencia de nucleótidos.

Definiciones

[0013] Actividad de fitasa: en el presente contexto, un polipéptido con actividad de fitasa (una fitasa) es una enzima que cataliza la hidrólisis de fitato (mioinositol hexaquis-fosfato) a (1) mioinositol y/o (2) mono-, di-, tri-, tetra- y/o penta-fosfatos de los mismos y (3) fosfato inorgánico.

[0014] El sitio web ENZYME (<http://www.expasy.ch/enzyme/>) es un depósito de información relacionada con la nomenclatura de enzimas. Principalmente se basa en las recomendaciones del *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUB-MB)) y describe cada tipo de enzima caracterizada para la que se ha proporcionado un número de EC (Comisión Enzimática) (Bairoch A. The ENZYME database, 2000, Nucleic Acids Res 28:304-305). Véase también el manual de *Enzyme Nomenclature* de NC-IUBBM, (1992).

[0015] Según el sitio ENZYME, se conocen tres tipos diferentes de fitasas: una 3-fitasa (mioinositol hexafosfato 3-fosfohidrolasa, EC 3.1.3.8), una 6-fitasa (mioinositol hexafosfato 6-fosfohidrolasa, EC 3.1.3.26), y una 5-fitasa (EC 3.1.3.72). Para los fines de la presente invención, todos los tipos se incluyen en la definición de fitasa.

[0016] Las fitasas de la invención pertenecen a la familia de las fosfatasa ácidas de histidina, que incluyen la fosfatasa ácida de *Escherichia coli* pH 2,5 (gen appA) al igual que fitasas fúngicas tales como las fitasas A y B de *Aspergillus awamorii* (EC: 3.1.3.8) (gen phyA y phyB). Las fosfatasa ácidas de histidina comparten dos regiones de similitud de secuencia, cada una centrada alrededor de un residuo de histidina conservado. Estas dos histidinas parecen estar implicadas en el mecanismo catalítico de las enzimas. La primera histidina está localizada en la sección N-terminal y forma un intermedio fosfo-histidina mientras que la segunda está localizada en la sección C-terminal y posiblemente actúa como donante de protón.

[0017] Las fitasas de la invención tienen un motivo de sitio activo conservado, a saber, R-H-G-X-R-X-P, donde X designa cualquier aminoácido (véanse los aminoácidos 16 a 22 de SEQ ID n°: 2 y 4).

[0018] Para los fines de la presente invención la actividad de fitasa se determina en la unidad de FYT, un FYT es la cantidad de enzima que libera 1 micro-mol de ortofosfato inorgánico por min. bajo las siguientes condiciones: pH 5,5; temperatura 37°C; sustrato: fitato de sodio (C₆H₆O₂₄P₆Na₁₂) en una concentración de 0,0050 mol/l. Los ensayos de fitasa adecuados son los ensayos FYT y FTU descritos en el Ejemplo 1 de la WO 00/20569. FTU es para determinar la actividad de fitasa en alimentos y premezclas. La actividad de fitasa también se puede determinar usando los ensayos de fitasa de los Ejemplos 4, 7 y 8 de este documento.

[0019] El pH óptimo de un polipéptido de la invención se determina mediante la incubación de la fitasa con varios valores de pH, usando un sustrato en una concentración predeterminada y una temperatura de incubación fija. El pH óptimo se determina luego con una representación gráfica de la actividad de fitasa contra el pH. En una forma de realización particular, se usa el ensayo FYT, a saber, el sustrato es de 5mM de fitato de sodio, la temperatura de reacción 37°C y la actividad se determina en unidades FYT con varios valores de pH, por ejemplo pH 2-12, usando tampones adecuados, tales como: 100mM de ácido succínico, 100mM de HEPES, 100mM de CHES, 100mM de CABS, 1mM de CaCl₂, 150mM de KCl, 0,01% de Tritón X-100 ajustado a valores de pH 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0, 11,0 y 12,0 con HCl o NaOH. En otra forma de realización particular, se usa el ensayo de fitasa de cualquiera de los ejemplos 4, 7 y 8, a saber, el sustrato es 0,5mM, preferiblemente 5mM, de Na-fitato, que se disuelve en un tampón con el pH deseado (tales como los mencionados anteriormente) y el fosfato soluble se determina por complejación con molibdato/hierro y medición de la densidad óptica a 750 nm o utilizando el ensayo de los ejemplos 7 y 8, con molibdato/vanadato y absorbancia de medición a 405 nm. Ensayo ciego (prueba del Ejemplo 4): se mezclan 20ul de muestra, 100ul de sustrato y 120ul de reactivo de color, se incuban 5 min a 37°C y el OD_{Blind} se mide a 750nm. Muestra: se mezcla 20ul de muestra, 100ul de sustrato, se incuba 30 min a 37°C, se añade 120ul de reactivo de color, se incuba 5 min a 37°C, y se mide la OD_{sample} a 750nm. La actividad de fitasa se mide como OD = OD_{sample} - OD_{Blind}. Un pH óptimo relativamente bajo se refiere a un pH óptimo por debajo de pH 5,0, por ejemplo por debajo de pH 4,5, 4,0,

3,5, 3,0, 2,5 o incluso por debajo de 2,0. Un pH óptimo relativamente alto se refiere a un pH óptimo por encima de pH 5,0, por ejemplo por encima de pH 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5 o incluso por encima de 9,0.

5 [0020] Polipéptido aislado: el término "polipéptido aislado" como se usa en este caso se refiere a un polipéptido que es al menos 20% puro, preferiblemente al menos 40% puro, más preferiblemente al menos 60% puro, incluso más preferiblemente al menos 80% puro, de la forma más preferible al menos 90% puro, y de la forma incluso más preferible al menos 95% puro, como determinado por SDS-PAGE.

10 [0021] Polipéptido substancialmente puro: el término "polipéptido substancialmente puro" denota aquí una preparación de polipéptido que contiene como mucho 10%, preferiblemente como mucho 8%, más preferiblemente como mucho 6%, más preferiblemente como mucho 5%, más preferiblemente como mucho 4%, como mucho 3%, incluso más preferiblemente como mucho 2%, de la forma más preferible como mucho 1%, y de la forma incluso más preferible como mucho 0,5% en peso de otro material de polipéptido con el que esté asociado originalmente. Por lo tanto, se prefiere que el polipéptido substancialmente puro sea al menos 92% puro, preferiblemente al menos 94% puro, más preferiblemente al menos 95% puro, más preferiblemente al menos 96% puro, más preferiblemente al menos 96% puro, más preferiblemente al menos 97% puro, más preferiblemente al menos 98% puro, incluso más preferiblemente al menos 99%, de la forma más preferible al menos 99,5% puro, y de la forma incluso más preferible 100% puro en peso del material de polipéptido total presente en la preparación.

20 [0022] Los polipéptidos de la presente invención preferiblemente están en una forma substancialmente pura. En particular, se prefiere que los polipéptidos estén en "forma esencialmente pura", es decir, que la preparación polipeptídica esté esencialmente libre de otro material polipeptídico con el que esté asociado originalmente. Esto se puede conseguir, por ejemplo, con la preparación del polipéptido mediante métodos recombinantes bien conocidos o mediante métodos de purificación tradicionales.

25 [0023] Aquí, el término "polipéptido substancialmente puro" es sinónimo de los términos "polipéptido aislado" y "polipéptido en forma aislada".

30 [0024] Identidad: la relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos está descrita por el parámetro "identidad".

35 [0025] Para los fines de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos, al igual que el grado de identidad entre dos secuencias de nucleótidos, se determina por el programa "Align" que es un alineamiento de Needleman-Wunsch (es decir, un alineamiento global), útil tanto para alineamientos de proteína como de ADN. La matriz de puntuación por defecto BLOSUM50 y la matriz de identidad por defecto se usan para alineamientos de proteína y de ADN respectivamente. La penalización para el primer residuo en un espacio es -12 para las proteínas y -16 para ADN. Mientras que las penalizaciones para residuos adicionales en un espacio es -2 para las proteínas y -4 para ADN.

40 [0026] "Align" forma parte del paquete FASTA, versión v20u6 (véase W. R. Pearson and D. J. Lipman (1988), "Improved Tools for Biological Sequence Analysis", PNAS 85:2444-2448, y W. R. Pearson (1990) "Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA," Methods in Enzymology 183:63-98). Los alineamientos FASTA de proteínas usan el algoritmo de Smith-Waterman sin limitación en el tamaño del espacio (véase "Smith-Waterman algorithm", T. F. Smith and M. S. Waterman (1981) J. Mol. Biol. 147:195-197).

45 [0027] El algoritmo de Needleman-Wunsch se describe en Needleman, S.B. y Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48: 443-453, y el programa Align por Myers y W. Miller en "Optimal Alignments in Linear Space" CABIOS (computer applications in the biosciences) (1988) 4:11-17.

50 [0028] El grado de identidad entre la secuencia objetivo (o muestra, o prueba) y una secuencia específica (p. ej. aminoácidos del 1 al 411 de SEQ ID n°: 2) también se puede determinar de la siguiente manera: las secuencias se alinean usando el programa "Align". Se determina el número de coincidencias perfectas ("N-coincidencia-perfecta") en el alineamiento (una coincidencia perfecta significa que hay los mismos residuos de aminoácidos en la misma posición del alineamiento, normalmente designado con una "I" en el alineamiento). La longitud de la secuencia específica (el número de residuos de aminoácidos) se determina ("N-específico", en el ejemplo mencionado arriba = 411). El grado de identidad se calcula como la proporción entre "N-específico" y "N-coincidencia-perfecta" (para convertir a identidad de porcentaje, multiplicar por 100).

60 [0029] En una forma de realización alternativa, el grado de identidad entre una secuencia objetivo (o muestra, o prueba) y la secuencia específica (p. ej. aminoácidos del 1 al 411 de SEQ ID n°: 2) se determina de la siguiente manera: las dos secuencias se alinean usando el programa "Align". El número de coincidencias perfectas ("N-coincidencia-perfecta") en el alineamiento se determina (una coincidencia perfecta significa que hay los mismos residuos de aminoácidos en la misma posición del alineamiento, normalmente designado con una "I" en el alineamiento). También se determina la longitud común de las dos secuencias alineadas, a saber, el número total de aminoácidos en la parte de superposición del alineamiento ("N-superposición"). El grado de identidad se calcula como la proporción entre "N-superposición" y "N-coincidencia-perfecta" (para conversión a identidad de porcentaje, multiplicar por 100). En una forma de realización, N-

superposición incluye los espacios de cabeza y cola creados por el alineamiento, si lo hay. En otra forma de realización, N- superposición excluye espacios de cabeza y cola creados por el alineamiento, si lo hay.

5 [0030] En otra forma de realización alternativa, el grado de identidad entre una secuencia objetivo (o muestra, o prueba) y una secuencia específica (p. ej. aminoácidos del 1 al 411 de SEQ ID n°: 2) se determina de la siguiente manera: las secuencias se alinean usando el programa "Align". El número de coincidencias perfectas ("N-coincidencia-perfecta") en el alineamiento se determina (una coincidencia perfecta significa que hay los mismos residuos de aminoácidos en la misma posición del alineamiento, normalmente designado con una "I" en el alineamiento). La longitud de la secuencia objetivo (el número de residuos de aminoácidos) se determina ("N-objetivo"). El grado de identidad se calcula como la proporción entre "N-objetivo" y "N-coincidencia-perfecta" (para conversión a identidad de porcentaje, multiplicar por 100).

15 [0031] Preferiblemente, la superposición es de al menos el 20% de la secuencia específica ("N-superposición" tal y como se ha definido anteriormente, dividida por el número de aminoácidos de la secuencia específica ("N-específico") y multiplicado por 100), más preferiblemente de al menos 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o al menos 95%. Esto significa que al menos el 20% (preferiblemente 25-95%) de los aminoácidos de la secuencia específica acaban siendo incluidos en la superposición, cuando la secuencia de muestra se alinea con la secuencia específica.

20 [0032] Como alternativa, la superposición es de al menos el 20% de la secuencia objetivo (o muestra, o prueba) ("N-superposición" tal y como se ha definido anteriormente, dividido por "N-objetivo" tal y como se ha definido anteriormente y multiplicado por 100), más preferiblemente de al menos 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o al menos 95%. Esto significa que al menos el 20% (preferiblemente 25-95%) de los aminoácidos de la secuencia objetivo acaban siendo incluidos en la superposición, cuando se alinean con la secuencia específica.

30 [0033] Fragmento de polipéptido: el término "fragmento de polipéptido" se define en este caso como un polipéptido con uno o más aminoácidos eliminados del amino y/o carboxi término de la parte peptídica madura de la secuencia específica, por ejemplo SEQ ID n°: 2 o 4, o una secuencia homóloga de la misma, donde el fragmento tiene actividad de fitasa. En formas de realización particulares, el fragmento contiene al menos 350, 360, 370, 380, 390, 400, 405, o al menos 410 residuos de aminoácidos.

35 [0034] Subsecuencia: el término "subsecuencia" se define en este caso como una secuencia de nucleótidos con uno o varios nucleótidos eliminados del final 5' y/o 3' de la parte de codificación de péptido maduro de la secuencia específica, por ejemplo SEQ ID n°: 1 o 3, o una secuencia homóloga de la misma, donde la subsecuencia codifica un fragmento de polipéptido con actividad de fitasa. En formas de realización particulares, la subsecuencia contiene al menos 1050, 1080, 1110, 1140, 1170, 1200, 1215 o al menos 1230 nucleótidos.

40 [0035] Variante alélica: el término "variante alélica" se refiere en este caso a dos o más formas alternativas cualesquiera de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge naturalmente por mutación y puede suponer polimorfismo dentro de poblaciones. Las mutaciones de genes pueden ser silenciosas (sin cambios en el polipéptido codificado) o puede codificar polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos alteradas. Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

45 [0036] Polinucleótido substancialmente puro: el término "polinucleótido substancialmente puro", como se usa en este caso, se refiere a una preparación polinucleótida libre de otros nucleótidos indeseados o extraños y en una forma adecuada para usarse en sistemas de producción de proteínas creadas genéticamente. Así, un polinucleótido sustancialmente puro contiene como mucho 10%, preferiblemente como mucho 8%, más preferiblemente como mucho 6%, más preferiblemente como mucho 5%, más preferiblemente como mucho 4%, más preferiblemente v 3%, incluso más preferiblemente como mucho 2%, mucho más preferiblemente como mucho 1%, y de la forma incluso más preferible como mucho 0,5% en peso de otro material polinucleótido con el que está asociado originalmente. Un polinucleótido substancialmente puro puede, no obstante, incluir regiones no traducidas 5' y 3' de origen natural, tales como promotores y terminadores. Se prefiere que el polinucleótido substancialmente puro sea al menos 90% puro, preferiblemente al menos 92% puro, más preferiblemente al menos 94% puro, más preferiblemente al menos 95% puro, más preferiblemente al menos 96% puro, más preferiblemente al menos 97%, puro, incluso más preferiblemente al menos 98% puro, mucho más preferiblemente al menos 99%, de la forma incluso más preferible al menos 99,5% puro en peso. Los polinucleótidos de la presente invención están preferiblemente en una forma substancialmente pura. En particular, se prefiere que los polinucleótidos descritos aquí estén en una "forma esencialmente pura", es decir, que la preparación polinucleótida esté esencialmente libre de otro material polinucleótido con el que esté asociado originalmente. Aquí, el término "polinucleótido substancialmente puro" es sinónimo de los términos "polinucleótido aislado" y "polinucleótido en forma aislada". Los polinucleótidos pueden ser de origen genómico, de ADNc, de ARN, semisintéticos, sintéticos o cualquier combinación de los mismos.

65 [0037] Constructo de ácido nucleico: el término "constructo de ácido nucleico" como se utiliza en este caso se refiere a una molécula de ácido nucleico, bien uni- o bicatenaria, que se aísla de un gen de origen natural o que se modifica para contener segmentos de ácido nucleico de modo que de otra manera no existirían en la naturaleza. El término constructo

de ácido nucleico es sinónimo del término "casete de expresión" cuando el constructo de ácido nucleico contiene las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia codificante de la presente invención.

5 [0038] Secuencia de control: el término "secuencia de control" se define aquí para incluir todos los componentes necesarios o ventajosos para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa o foránea de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Tales secuencias de control incluyen, entre otros, una secuencia líder, de poliadenilación, secuencia de propéptido, promotor, secuencia de péptido señal y terminador de transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor y señales de parada traduccionales y transcripcionales. Las secuencias de control se pueden proporcionar con
10 enlazadores para introducir sitios de restricción específicos que faciliten la unión de las secuencias de control con la región codificante de la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido.

[0039] Operativamente enlazado: el término "operativamente enlazado" se refiere aquí a una configuración en la que una secuencia de control se coloca en una posición apropiada con respecto a la secuencia codificante de la secuencia polinucleótida de manera que la secuencia de control dirija la expresión de la secuencia codificante de un polipéptido.
15

[0040] Secuencia codificante: cuando se usa aquí el término "secuencia codificante" se refiere a una secuencia de nucleótidos que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de su producto proteínico. Los bordes de la secuencia codificante se determinan generalmente por un marco de lectura abierto, que normalmente comienza con el codón de inicio ATG o codones de inicio alternativos tales como TTG y GTG. La secuencia codificante puede ser una secuencia de ADN, ADNc o secuencia de nucleótidos recombinante.
20

[0041] Parte de polipéptido maduro: cuando se usan aquí los términos "parte de polipéptido maduro" o "parte de péptido maduro" se refiere a la parte del polipéptido agregada por una célula que contiene, como parte de su equipamiento genético, un polinucleótido que codifica el polipéptido. En otras palabras, la parte de polipéptido maduro se refiere a la parte del polipéptido que permanece después de que la parte de péptido señal se escinda una vez ha ejecutado su función de dirección del polipéptido codificado a la vía secretora de la célula. La parte del péptido señal predicho de SEQ ID n°: 2 y 4 es los aminoácidos -22 a -1 del mismo, lo que significa que la parte de polipéptido predicho maduro de SEQ ID n°: 2 y 4 corresponde a los aminoácidos 1 a 411 del mismo. No obstante, puede ocurrir una ligera variación de célula huésped a célula huésped, y por lo tanto se prefiere la parte de polipéptido maduro de expresión.
25
30

[0042] Parte codificante de polipéptido maduro: cuando se usa aquí el término "parte codificante de polipéptido maduro" o "secuencia codificante de polipéptido maduro" se refiere a la parte del polinucleótido que codifica el polipéptido que codifica la parte de polipéptido maduro. Por ejemplo, para la SEQ ID n°: 1, la parte codificante de polipéptido maduro predicho corresponde a los nucleótidos 67 a 1299 (aminoácidos codificantes 1 a 411 de SEQ ID n°: 2).
35

[0043] Expresión: el término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción del polipéptido incluyendo, entre otros, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.

[0044] Vector de expresión: el término "vector de expresión" se define aquí como una molécula de ADN circular o lineal que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de la invención y que se enlaza operativamente a nucleótidos adicionales que proporcionan su expresión.
40

[0045] Célula huésped: el término "célula huésped", como se utiliza en este caso, incluye cualquier tipo de célula que sea capaz de transformación, transfección, transducción y similares con un constructo de ácido nucleico que comprende un polinucleótido de la presente invención.
45

[0046] Modificación: el término "modificación" se refiere en este caso a cualquier modificación química del polipéptido específico, por ejemplo el polipéptido que consiste en los aminoácidos 1 a 411 de SEQ ID n°: 2 o 4, así como la manipulación genética del ADN que codifica ese polipéptido. La(s) modificación(es) puede(n) ser sustitución(es), delección(es) y/o inserción(es) del(de los) aminoácido(s) así como sustitución(es) de cadena(s) lateral(es) de aminoácidos.
50

[0047] Variante Artificial: cuando se usa en este caso, el término "variante artificial" se refiere a un polipéptido con actividad de fitasa producida por un organismo que expresa una secuencia de nucleótidos modificada de SEQ ID n°: 1 o 3. La secuencia de nucleótidos modificada se obtiene por intervención humana mediante la modificación de la secuencia de nucleótidos con SEQ ID n°: 1 o 3.
55

Descripción detallada de la divulgación

60 Polipéptidos con actividad de fitasa

[0048] En un primer aspecto, la presente invención se refiere a polipéptidos aislados con una secuencia de aminoácidos que tiene un grado de identidad con los aminoácidos 1 a 411 de SEQ ID n°: 2 (es decir, el polipéptido maduro) de al menos 98,8%.
65

[0049] En formas de realización particulares, el grado de identidad es de al menos 98,9%, 99%, 99,0%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% o al menos 99,9%, con actividad de fitasa (de ahora en adelante "polipéptidos homólogos").

5 [0050] En otras formas de realización particulares, los polipéptidos homólogos tienen una secuencia de aminoácidos que difiere en cinco, cuatro, tres, dos, o un aminoácido de los aminoácidos de 1 al 411 de SEQ ID n°: 2.

[0051] En formas de realización particulares, el polipeptídico comprende aminoácidos del 1 al 411 de SEQ ID n°: 2 que tienen actividad de fitasa.

10

[0052] En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a polipéptidos aislados con una secuencia de aminoácidos que comprende aminoácidos del 1 al 411 de SEQ ID n°: 4 que tienen actividad de fitasa.

15

[0053] Los polipéptidos aislados que tienen actividad de fitasa son codificados por polinucleótidos que hibridan bajo condiciones de astringencia al menos medias, preferiblemente medias, con los nucleótidos (i) 67 a 1299 de SEQ ID n°: 1, (ii) la parte codificante de polipéptido maduro de SEQ ID n°: 1, y/o (iii) una cadena complementaria de cualquiera (i), y (ii), y/o (iv) una subsecuencia de (i), (ii) o (iii) (J. Sambrook, E.F. Fritsch, and T. Maniatus, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d edition, Cold Spring Harbor, New York). Una subsecuencia de SEQ ID n°: 1 contiene al menos 100 nucleótidos contiguos o preferiblemente al menos 200 nucleótidos contiguos. Por otra parte, la subsecuencia puede codificar un fragmento polipeptídico que tiene actividad de fitasa.

20

[0054] La hibridación se desarrolla bajo condiciones de astringencia al menos medio altas, al menos altas o al menos muy altas; preferiblemente bajo condiciones de astringencia medio altas, altas o muy altas.

25

[0055] Alternativamente, la hibridación se desarrolla condiciones de astringencia muy bajas o bajas.

[0056] La secuencia de nucleótidos de SEQ ID n°: 1, o una subsecuencia de la misma, así como la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n°: 2, o un fragmento de la misma, se pueden utilizar para diseñar una sonda de ácido nucleico para identificar y clonar polipéptidos codificantes de ADN que tienen actividad de fitasa de cepas de diferentes géneros o especies según métodos bien conocidos en la técnica. En particular, tales sondas se pueden usar para hibridación con el genómico o ADNc del género o especie de interés, siguiendo procedimientos estándar de transferencia de Southern, para identificar y aislar el gen correspondiente del mismo. Tales sondas pueden ser considerablemente más cortas que la secuencia entera, pero deberían ser de al menos 14, preferiblemente al menos 25, más preferiblemente al menos 35, y de la forma más preferible al menos 70 nucleótidos de longitud. No obstante, se prefiere que la sonda de ácido nucleico sea de al menos 100 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, la sonda de ácido nucleico puede ser de al menos 200 nucleótidos, preferiblemente de al menos 300 nucleótidos, más preferiblemente de al menos 400 nucleótidos o de la forma más preferible de al menos 500 nucleótidos de longitud. Se pueden utilizar sondas incluso más largas, por ejemplo, sondas de ácido nucleico que sean de al menos 600 nucleótidos, preferiblemente al menos 700 nucleótidos, más preferiblemente al menos 800 nucleótidos o de la forma más preferible al menos 900 nucleótidos de longitud. Se pueden utilizar sondas tanto de ADN como de ARN. Las sondas se marcan típicamente para detección del gen correspondiente (por ejemplo, con ³²P, ³H, ³⁵S, biotina o avidina). Tales sondas están abarcadas por la presente invención.

30

35

40

45

[0057] Una biblioteca de ADN genómico obtenida a partir de tales otros organismos se puede, por lo tanto, cribar para identificar ADN que hibrida con las sondas anteriormente descritas y que codifica un polipéptido con actividad de fitasa. El ADN genómico u otro obtenido a partir de tales otros organismos se puede separar por electroforesis en gel de poliacrilamida o agarosa u otras técnicas de separación. El ADN de las bibliotecas o el ADN separado se puede transferir e inmovilizar en nitrocelulosa u otro material portador adecuado. Para identificar un clon o ADN que sea homólogo de la SEQ ID n°: 1, o de una subsecuencia de la misma, el material portador se usa en una transferencia de Southern.

50

[0058] La hibridación indica que la secuencia de nucleótidos hibrida a una sonda de ácido nucleico marcada correspondiente a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID n°: 1, la cadena complementaria de la misma, o una subsecuencia de la misma, bajo condiciones de astringencia de muy bajas a muy altas. Las moléculas a las que la sonda de ácido nucleico hibrida bajo estas condiciones se puede detectar usando una película de rayos X.

55

[0059] En una forma particular, la sonda de ácido nucleico es cualquiera de SEQ ID n°: 1 y 3-8. Además, la sonda de ácido nucleico es la cadena complementaria de los nucleótidos 67 a 450, nucleótidos 450 a 900 o nucleótidos 900 a 1299 de SEQ ID n°: 1. Todavía más, la sonda de ácido nucleico es una secuencia polinucleótida que codifica el polipéptido de SEQ ID n°: 2 o una subsecuencia de la misma. Todavía más, la sonda de ácido nucleico es SEQ ID n°: 1, en particular cualquiera de las regiones codificantes de polipéptidos maduros de las mismas.

60

[0060] Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, las condiciones de astringencia de muy bajas a muy altas se definen como prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 0,3% de SDS, 200 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y cortado y bien 25% de formamida para astringencias muy bajas y bajas, 35% de

65

formamida para astringencias medias y medio altas o 50% de formamida para astringencias altas y muy altas, siguiendo los procedimientos estándar de transferencia de Southern durante 12 a 24 horas óptimamente.

5 [0061] Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, el material portador finalmente se lava tres veces cada uno durante 15 minutos usando 2X SSC, 0,2% de SDS preferiblemente al menos a 45°C (astringencia muy baja), más preferiblemente al menos a 50°C (astringencia baja), más preferiblemente al menos a 55°C (astringencia media), más preferiblemente al menos a 60°C (astringencia medio alta), incluso más preferiblemente al menos a 65°C (astringencia alta) y de la forma más preferible al menos a 70°C (astringencia muy alta).

10 [0062] Para sondas cortas que son de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, las condiciones de astringencia se definen como prehibridación, hibridación y post-hibridación de lavado de aproximadamente 5°C a aproximadamente 10°C por debajo de la T_m calculada usando el cálculo según Bolton y McCarthy (1962, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 48:1390) en 0,9 M de NaCl, 0,09 M de Tris-HCl
15 pH 7,6, 6 mM de EDTA, 0,5% de NP-40, 1 X de solución de Denhardt, 1 mM de pirofosfato de sodio, 1 mM de fosfato monobásico de sodio, 0,1 mM de ATP y 0,2 mg de ARN de levadura por ml siguiendo los procedimientos estándar de transferencia de Southern.

[0063] Para sondas cortas que son de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, el material portador se lava una vez en 6X SSC más 0,1% de SDS durante 15 minutos y dos veces cada uno durante 15 minutos usando 6X SSC de 5°C a 10°C por debajo de la T_m calculada.
20

[0064] Bajo condiciones de hibridación con contenido en sal, la T_m efectiva es la que controla el grado de identidad requerido entre la sonda y el ADN unido al filtro para que la hibridación tenga éxito. La T_m eficaz se puede determinar usando la fórmula que aparece más abajo para determinar el grado de identidad requerido para que dos ADNs hibriden bajo varias condiciones de astringencia.
25

$$T_m \text{ efectiva} = 81,5 + 16,6(\log M[\text{Na}^+]) + 0,41(\%G+C) - 0,72(\%formamida)$$

(Véase: www.ndsu.nodak.edu/instruct/mcclean/plsc731/dna/dna6.htm)
30

[0065] "G+C" designa el contenido de nucleótidos G y T en la sonda. Para astringencia media, por ejemplo, la formamida es del 35% y la concentración de Na⁺ para 5X SSPE es de 0,75 M.

35 [0066] La fitasa de la invención tiene una actividad residual tras la incubación a 37°C y en un tampón de 0,1 M de glicina/HCl, pH 2,0, durante 4 horas de al menos 20%, en comparación con la actividad de tiempo, t = 0, la actividad (y la actividad residual) siendo evaluada a 37°C y pH 5,5 en 1% (p/v) de Na-fitato, usando un tampón de 0,25 M de Na-acetato pH 5,5, tampón ciego sustraído. En las formas de realización preferidas, la actividad residual es de al menos 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% o al menos 80%. En otra forma de realización, la fitasa de la invención tiene una actividad residual tras la incubación a 37°C y en un tampón de 0,1 M de glicina/HCl, pH 2,5, durante 1 día (24 horas) de al menos 20%, en comparación con la actividad en tiempo, t = 0, la actividad (y la actividad residual) siendo evaluada a 37°C y pH 5,5 en 1% (p/v) de Na-fitato, usando un tampón de 0,25 M de Na-acetato pH 5,5, tampón ciego sustraído. En formas de realización preferidas, la actividad residual es de al menos 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% o al menos 80%.

45 [0067] Los polipéptidos aislados con actividad de fitasa pueden tener las siguientes propiedades fisicoquímicas (analizadas en los polipéptidos substancialmente puros):

(i) una alta actividad específica, tal y como una actividad específica en fitato de al menos 50% de la actividad específica de *E. coli* appA (SPTREMBL:Q8GN88), la actividad específica midiéndose preferiblemente en las unidades de FYT por mg de proteína enzimática de fitasa;
50

(ii) estabilidad al ácido; tal como:

(a) al menos 60%, preferiblemente al menos 65%, al menos 70% o al menos 75% de actividad residual después de incubación durante la noche a 37°C en el tampón de ácido de glicina/clorhídrico pH 2,2, con respecto a la actividad residual tras la incubación durante la noche a 37°C en tampón de HEPES pH 7,0.
55

(b) al menos 80%, preferiblemente al menos 85%, al menos 90% o al menos 95% de actividad residual después de incubación durante la noche a 37°C en el tampón de ácido de glicina/clorhídrico pH 3,0, con respecto a la actividad residual tras la incubación durante la noche a 37°C en el tampón de HEPES pH 7,0 y/o
60

(c) una actividad de fitasa residual después de 2 horas de incubación a una temperatura de 25, 30, 35 o 37°C, preferiblemente 37°C, y un pH de 2,2, 2,4, 2,5, 2,6, 2,8, 3,0, 3,2, 3,4, o 3,5, preferiblemente tampones de ácido de glicina/clorhídrico de pH 2,2, o 3,0, de al menos 50%, con respecto a la actividad residual de *E. coli* appA (SPTREMBL:Q8GN88);
65

(iii) estabilidad térmica, tal y como una actividad de fitasa residual después de 0,5, 1, 1,5 o 2 horas, preferiblemente 0,5 horas, de incubación con un pH de 5,5 y una temperatura de 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 o 95°C, preferiblemente 70°C, de al menos 50%, comparada con la actividad residual de *E. coli* appA (SPTREMBL:Q8GN88);

(iv) estabilidad de proteasa, tal y como una actividad de fitasa residual después de 0,5, 1, 1,5 o 2 horas, preferiblemente 1 hora, de incubación a una temperatura de 20, 25, 30, 35, o 37°C, preferiblemente 37°C y un pH de 5,5, en presencia de 0,1 mg/ml de pepsina, de al menos 50%, comparada con la actividad residual de *E. coli* appA (SPTREMBL:Q8GN88); y/o

(v) un pH óptimo por debajo de pH 5,0, por ejemplo por debajo de pH 4,5, 4,0, 3,5, 3,0, 2,5, o incluso por debajo de 2,0, determinado usando el ensayo FYT, y/o usando el ensayo del Ejemplo 4, como se describe anteriormente.

Particularmente, en el punto (i) anterior, la actividad específica es de al menos 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 o al menos 150% de la actividad específica de *E. coli* appA. En formas de realización particulares de cada uno de los aspectos (ii) a (iv) anteriores, la actividad residual es de al menos 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 o al menos 150% de la actividad residual de *E. coli* appA.

[0068] La actividad de la enzima de la invención, a pH 5,0 y 37°C, medida en el sustrato de pNP-fosfato es inferior a 11% de la actividad de la enzima medida en el sustrato fitato, con referencia al Ejemplo 7 de la presente. Preferiblemente, la proporción es inferior al 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, o inferior al 5%. La proporción de pNP para hidrólisis de fitato es indicativa de la naturaleza de fitasa real de la enzima. Una alta proporción de actividad en pNP con respecto a la actividad en el fitato puede indicar que la enzima en cuestión es una fosfatasa con especificidad de sustrato relativamente baja, mientras que una baja proporción, como es el caso de la fitasa evaluada en el Ejemplo 7, indica que es una enzima que acepta más específicamente fitato como sustrato.

[0069] La fitasa de la invención tiene una mayor liberación de fósforo (P) en el modelo *in vitro* del Ejemplo 6 de la presente, en comparación con la fitasa de *Peniophora lycii*, preferiblemente al menos 110% de la misma, más preferiblemente al menos 120%, 130% o al menos 140% de la misma. En una forma de realización, la fitasa de la invención, dosificada 0,25 FTU/g de alimento, libera al menos 150% de fósforo (P), con respecto al fósforo liberado por la fitasa de *Peniophora lycii*, también dosificada 0,25 FTU/g de alimento, en el modelo *in vitro* del Ejemplo 6 de la presente. Preferiblemente, la liberación es de al menos 155%, 160%, 165%, 170%, 175% o al menos 180%. En otra forma de realización, la fitasa de la invención, dosificada 0,75 FTU/g de alimento, libera al menos 150% de fósforo (P), con respecto al fósforo liberado por la fitasa de *Peniophora lycii*, también dosificada 0,75 FTU/g de alimento, en el modelo *in vitro* del Ejemplo 6 de la presente. Preferiblemente, la liberación es de al menos 155%, 160%, 165%, 170%, 175%, 180%, 185% o al menos 190% (véase la Tabla 2 del Ejemplo 6: 367/190 son 193).

[0070] La presente invención puede referirse a variantes artificiales que comprenden una sustitución, delección y/o inserción conservadora de uno o más aminoácidos de SEQ ID n°: 2, o el polipéptido maduro de las mismas. Una inserción puede estar dentro de la molécula y/o en el extremo N- y/o C-terminal de la molécula, en cuyo caso también se denomina extensión. Preferiblemente, los cambios de aminoácidos son de naturaleza menor, esto es sustituciones de aminoácidos conservadoras; pequeñas delecciones, típicamente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; pequeñas extensiones de amino- o carboxi-terminales, tales como un residuo de metionina aminoterminal, un pequeño péptido enlazador de hasta aproximadamente 20-25 residuos o una pequeña extensión que facilita la purificación mediante el cambio de la carga neta u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión, en otras palabras, cambios que no afectan significativamente al plegado y/o a la actividad de la proteína.

[0071] Ejemplos de sustituciones conservadoras están dentro del grupo de los aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina).

[0072] Otros ejemplos de sustituciones conservadoras son sustituciones de los 20 aminoácidos estándar por aminoácidos no estándar (tales como 4-hidroxiprolina, 6-N-metil lisina, ácido 2-aminoisobutírico, isovalina y alfa-metil serina). Las sustituciones conservadoras también pueden incluir sustituciones en los aminoácidos que no se codifican por el código genético y aminoácidos no naturales. Los "aminoácidos no naturales" se han modificado después de la síntesis de proteína y/o tienen una estructura química en su(s) cadena(s) lateral(es) diferente de la de los aminoácidos estándar. Los aminoácidos no naturales pueden sintetizarse químicamente y, preferiblemente, están disponibles comercialmente e incluyen ácido pipercolico, ácido carboxílico de tiazolidina, dehidroprolina, 3- y 4-metilprolina y 3,3-dimetilprolina.

[0073] En una forma de realización particular, la variante no incluye todas las siguientes cuatro sustituciones en combinación: N31D, Q139K, L197F, N316K. En otra forma de realización particular, la variante no comprende todas las siguientes cuatro sustituciones en combinación: N31D, N121T, K132T, Q139K.

[0074] Alternativamente, los cambios en los aminoácidos son de tal naturaleza que las propiedades físico químicas de los polipéptidos se alteran. Por ejemplo, los cambios en los aminoácidos pueden mejorar la termoestabilidad del polipéptido, alterar la especificidad del sustrato, cambiar el pH óptimo y similares.

5 [0075] Los aminoácidos esenciales del polipéptido progenitor se pueden identificar según procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida o mutagénesis de escaneado de alanina (Cunningham and Wells, 1989, Science 244: 1081- 1085). En la técnica anterior, las mutaciones de alanina únicas se introducen en cada residuo de la molécula y las moléculas mutantes resultantes se evalúan para actividad biológica (es decir, actividad de fitasa) para
10 identificar residuos de aminoácidos que sean críticos para la actividad de la molécula. Véase también, Hilton *et al.*, 1996, J. Biol. Chem. 271: 4699-4708. El sitio activo de la enzima u otra interacción biológica se puede determinar también mediante análisis físico de estructura, como se determina por técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrones o marcaje por fotoafinidad, conjuntamente con mutación de aminoácidos del sitio de contacto putativo. Véase, por ejemplo, de Vos *et al.*, 1992, Science 255: 306-312; Smith *et al.*, 1992, J. Mol. Biol. 224: 899-904; Wlodaver *et al.*, 1992, FEBS Lett. 309:59-64. Las identidades de los aminoácidos esenciales también
15 se pueden inferir de análisis de identidades con polipéptidos que están relacionados con un polipéptido según la invención.

[0076] Se pueden hacer sustituciones de aminoácidos múltiples o únicos y evaluarlos usando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación y/o redistribución, seguido de un procedimiento de selección pertinente, tales como los descritos por Reidhaar-Olson y Sauer, 1988, Science 241: 53-57; Bowie and Sauer, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2152-2156; WO 95/17413; o WO 95/22625. Otros métodos que se pueden usar incluyen PCR con tendencia al error, exposición en fago (p. ej., Lowman *et al.*, 11991, Biochem. 30:10832-10837; U.S. Patent No. 5,223,409; WO 92/06204) y mutagénesis dirigida por región (Derbyshire *et al.*, 1986, Gene 46:145; Ner *et al.*, 1988, DNA 7:127).

25 [0077] Los métodos de mutagénesis/redistribución se pueden combinar con métodos de selección de alto rendimiento, automatizados para detectar actividad de polipéptidos clonados, mutagenizados expresados por células huésped. Las moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos activos se pueden recuperar de las células huésped y secuenciar rápidamente utilizando métodos estándar en la técnica. Estos métodos permiten la rápida determinación de la importancia de residuos de aminoácidos individuales en un polipéptido de interés y se pueden aplicar a polipéptidos de estructura desconocida.
30

[0078] El número total de sustituciones (sustituciones preferiblemente conservadoras), deleciones y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de los aminoácidos del 1 al 411 de SEQ ID n°: 2 es como mucho 10, preferiblemente como mucho 9, más preferiblemente como mucho 8, más preferiblemente como mucho 7, más preferiblemente como mucho 6, más preferiblemente como mucho 5, más preferiblemente como mucho 4, incluso más preferiblemente como mucho 3, mucho más preferiblemente como mucho 2 y de la forma incluso más preferible 1.
35

[0079] El número total de sustituciones, deleciones y/o inserciones de los aminoácidos 1 a 411 de SEQ ID n°: 2 es 10, preferiblemente 9, más preferiblemente 8, más preferiblemente 7, más preferiblemente como mucho 6, más preferiblemente como mucho 5, más preferiblemente 4, incluso más preferiblemente 3, mucho más preferiblemente 2 y de la forma incluso más preferible 1. Alternativamente, el número total de sustituciones (sustituciones preferiblemente conservadoras), deleciones y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de los aminoácidos 1 a 411 de SEQ ID n°: 2 es como mucho 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12 o como mucho 11.
40

45 [0080] En una forma de realización específica, el polipéptido de la invención es una variante hipoalérgica, diseñada para invocar una respuesta inmunológica reducida cuando se expone a animales, incluyendo seres humanos. El término respuesta inmunológica debe entenderse como cualquier reacción del sistema inmunológico de un animal expuesto al polipéptido. Un tipo de respuesta inmunológica es una respuesta alérgica que lleva a niveles aumentados de IgE en el animal expuesto. Se pueden preparar variantes hipoalérgicas usando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo el polipéptido se puede conjugar con partes de protección de fracciones poliméricas o epítopos del polipéptido implicado en una respuesta inmunológica. La conjugación con polímeros puede implicar el acoplamiento químico *in vitro* del polímero al polipéptido, por ejemplo como se describe en la WO 96/17929, WO98/30682, WO98/35026, y/o WO99/00489. La conjugación puede además o alternativamente implicar acoplamiento de polímeros al polipéptido *in vivo*. Tal conjugación se puede conseguir mediante ingeniería genética de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido, insertando secuencias de consenso que codifican sitios de glicosilación adicionales en el polipéptido y que expresan el polipéptido en un huésped capaz de glicosilar el polipéptido, véase por ejemplo la WO00/26354. Otra forma de proporcionar variantes hipoalérgicas es la manipulación genética de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de manera que haga que el polipéptido se auto-oligomerece haciendo que los monómeros polipeptídicos protejan los epítopos de otros monómeros polipeptídicos reduciendo así la antigenicidad de los oligómeros. Tales productos y su preparación se describen por ejemplo en la WO96/16177. Los epítopos implicados en una respuesta inmunológica pueden identificarse por varios métodos, tal como el método de exposición en fagos descrito en la WO 00/26230 y la WO 01/83559 o el enfoque aleatorio descrito en la EP 561907. Una vez que se ha identificado un epítipo, su secuencia de aminoácidos se puede alterar para producir propiedades inmunológicas alteradas del polipéptido por técnicas de manipulación genética conocidas tales como mutagénesis dirigida de sitio (véase por ejemplo WO 00/26230, WO 00/26354 y/o WO00/22103) y/o la conjugación de un polímero se puede realizar lo suficientemente cerca del epítipo para que el polímero proteja el epítipo.
50
55
60
65

Fuentes de polipéptidos que tienen actividad de fitasa

- 5 [0081] Un polipéptido de la presente invención se puede obtener a partir de microorganismos de cualquier género. Para fines de la presente invención, el término "obtenido a partir de" como se utilizan en este caso en relación con una fuente dada debe significar que el polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos se produce por la fuente o por una cepa en la que la secuencia de nucleótidos de la fuente se ha insertado. En un aspecto preferido, el polipéptido obtenido de una fuente dada se segrega extracelularmente.
- 10 [0082] Un polipéptido de la presente invención puede ser un polipéptido bacteriano. Por ejemplo, el polipéptido puede ser un polipéptido bacteriano gram positivo tal como un polipéptido de *Bacillus*, o un polipéptido de *Streptomyces*; o un polipéptido bacteriano gram negativo, por ejemplo, un polipéptido de *Escherichia coli*, *Yersinia*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, o *Pseudomonas*. En una forma de realización particular, el polipéptido se deriva de *Proteobacteria*, tales como *GammaProteobacteria*, por ejemplo *Enterobacteriales*, tales como *Enterobacteriaceae*.
- 15 [0083] En un aspecto particular, el polipéptido derivado de *Enterobacteriaceae* es un polipéptido de *Citrobacter*, tal como un *Citrobacter amalonaticus*, *Citrobacter braakii*, *Citrobacter farmeri*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter gillenii*, *Citrobacter intermedius*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter murlinae*, *Citrobacter rodentium*, *Citrobacter sedlakii*, *Citrobacter werkmanii*, *Citrobacter youngae* o polipéptido de especies de *Citrobacter*.
- 20 [0084] En un aspecto más preferido, el polipéptido es un polipéptido de *Citrobacter braakii*, y de la forma más preferible un polipéptido de *Citrobacter braakii* ATCC 51113, por ejemplo, el polipéptido de SEQ ID n°: 4. La cepa específica está públicamente disponible en la *American Type Culture Collection* (Colección Americana de Cultivos Tipo), ATCC.
- 25 [0085] Un polipéptido de la presente invención también puede ser un polipéptido fúngico, tal como un polipéptido de levadura o un polipéptido fúngico filamentoso.
- [0086] Las cepas de los microorganismos anteriores son de fácil acceso para el público en varias colecciones de cultivo, tales como la *American Type Culture Collection* (ATCC), *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSMZ), *Centraalbureau Voor Schimmelcultures* (CBS) y *Agricultural Research Service Patent Culture Collection*, *Northern Regional Research Center* (NRRL).
- 30 [0087] Además, tales polipéptidos se pueden identificar y obtener de otras fuentes, incluyendo microorganismos aislados de la naturaleza (p. ej., tierra, abonos, agua, etc.) usando las sondas arriba mencionadas. Las técnicas para aislar microorganismos de hábitats naturales son bien conocidas en la técnica. El polinucleótido se puede obtener después mediante selección de forma similar de una biblioteca genómica o genoteca de ADNc de otro microorganismo. Una vez que una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido se ha detectado con la(s) sonda(s), el polinucleótido se puede aislar o clonar utilizando técnicas que son bien conocidas por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).
- 35 [0088] Los polipéptidos de la presente invención también incluyen polipéptidos fusionados o polipéptidos divisibles de fusión en los que otro polipéptido se fusiona en el N-término o el C-término del polipéptido o fragmento del mismo. Un polipéptido fusionado se produce por fusión de una secuencia de nucleótidos (o una parte de la misma) que codifica otro polipéptido a una secuencia de nucleótidos (o una parte de la misma) de la presente invención. Las técnicas para producir polipéptidos de fusión se conocen en la técnica e incluyen ligamiento de las secuencias de codificación que codifican los polipéptidos de modo que estén en bastidor y que esa expresión del polipéptido fusionado esté bajo control del mismo promotor(es) y terminador.
- 40 [0089] Polinucleótidos
- 50 [0089] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican un polipéptido con actividad de fitasa, seleccionado del grupo que consiste en:
- 55 (a) un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene como mínimo 98,8% de identidad con los aminoácidos del 1 al 411 de SEQ ID n°: 2, donde la identidad se determina por el programa "Align" usando la matriz de puntuación por defecto BLOSUM50, la penalización para el primer residuo en un espacio es -12 mientras que la penalización para residuos adicionales en un espacio es -2, y
- 60 (b) un polinucleótido que tiene como mínimo 98,5% de identidad con los nucleótidos del 67 al 1299 de SEQ ID n°: 1, donde la identidad se determina mediante el programa "Align" usando la matriz de identidad por defecto, la penalización para el primer nucleótido en un espacio es -16, mientras que la penalización para nucleótidos adicionales en un espacio es -4, y
- donde la fitasa codificada tiene una actividad residual tras la incubación a 37°C y en un tampón de 0,1 M de glicina/HCl pH 2,0 durante 4 horas de al menos 20%.
- 65 [0090] La presente invención también se refiere a polinucleótidos mutantes que comprenden al menos una mutación en la secuencia codificante del polipéptido maduro de cualquiera de las SEQ ID n°: 1 o 3, en las que la secuencia del nucleótido mutante codifica un polipéptido que consiste en aminoácidos del 1 al 411 de SEQ ID n°: 2 o 4.

[0091] Las técnicas usadas para aislar o clonar un polinucleótido que codifica un polipéptido se conocen en la técnica e incluyen aislamiento del ADN genómico, preparación a partir de ADNc o una combinación de las mismas. La clonación de los polinucleótidos de la presente invención a partir de tal ADN genómico se puede efectuar, por ejemplo, usando la bien conocida reacción en cadena de polimerasa (PCR) o por selección de anticuerpos a partir de bibliotecas de expresión para detectar fragmentos de ADN clonados con características estructurales compartidas. Véase, por ejemplo, Innis *et al.*, 1990, PCR: A Guide to Methods and Application, Academic Press, New York. Se pueden utilizar otros procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos tales como la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la transcripción activada ligada (LAT) y la amplificación basada en secuencias de nucleótidos (NASBA). Los polinucleótidos se pueden clonar a partir de una cepa de *Citrobacter* u organismo relacionado u otros y así, por ejemplo, puede ser una variante alélica o de especies de la región codificante del polipéptido de la secuencia de nucleótidos.

[0092] La presente invención también se refiere a polinucleótidos con secuencias de nucleótidos que tienen un grado de identidad con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID n°: 1 (es decir, nucleótidos 67 a 1299) de al menos 98,5% y que codifican un polipéptido con actividad de fitasa. En formas de realización particulares, el grado de identidad es de al menos 98,6, 98,7, 98,9, 99, 99,0, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8 o al menos 99,9%.

[0093] La presente invención también se refiere a polinucleótidos con secuencias de nucleótidos que tienen la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID n°: 3 (es decir, nucleótidos 67 a 1299) y que codifican un polipéptido con actividad de fitasa.

[0094] La modificación de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser necesaria para la síntesis de polipéptidos sustancialmente similares al polipéptido. El término "sustancialmente similar" al polipéptido se refiere a formas del polipéptido que se producen de forma no natural. Estos polipéptidos pueden diferir de alguna manera creada genéticamente del polipéptido aislado de su fuente nativa, por ejemplo, variantes artificiales que difieren en actividad específica, termoestabilidad, pH óptimo o similares. La secuencia variante se puede construir sobre la base de la secuencia del nucleótido presentada como la región codificante del polipéptido de SEQ ID n°: 1, por ejemplo, una subsecuencia de la misma y/o por introducción de sustituciones de nucleótidos que no den lugar a otra secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos, sino que corresponda al uso de codón del organismo huésped para la producción del polipéptido, o por introducción de sustituciones de nucleótidos que puedan dar lugar a una secuencia de aminoácidos diferente. Para una descripción general de sustitución de nucleótidos, véase, por ejemplo, Ford *et al.*, 1991, Protein Expression and Purification 2: 95-107.

[0095] Será evidente para los expertos en la técnica que tales sustituciones se pueden hacer fuera de las regiones críticas para la función de la molécula y seguir dando como resultado un polipéptido activo. Los residuos de aminoácidos esenciales para la actividad del polipéptido codificado por un polinucleótido aislado de la invención, y por lo tanto preferiblemente no sujeto a sustitución, se pueden identificar de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, tal y como mutagénesis dirigida o mutagénesis de escaneado de alanina (véase, por ejemplo, Cunningham and Wells, 1989, Science 244: 1081-1085). En la técnica anterior, las mutaciones se introducen en cada residuo de la molécula cargado positivamente, y las moléculas mutantes resultantes se evalúan para actividad de fitasa para identificar residuos de aminoácidos que sean críticos para la actividad de la molécula. Los sitios de interacción sustrato-polipéptido también se pueden determinar mediante el análisis de la estructura tridimensional tal y como se determina por técnicas tales como el análisis de resonancia magnética nuclear, la cristalografía o el etiquetado de fotoafinidad (véase, por ejemplo, de Vos *et al.*, 1992, Science 255: 306-312; Smith *et al.*, 1992, Journal of Molecular Biology 224: 899-904; Wlodaver *et al.*, 1992, FEBS Letters 309: 59-64).

[0096] Los polinucleótidos aislados que codifican un polipéptido de la presente invención pueden hibridar bajo condiciones de astringencia medias, más preferiblemente condiciones de astringencia medio altas, incluso más preferiblemente condiciones de astringencia altas y de la forma más preferible condiciones de astringencia muy altas con: (i) los nucleótidos 67 a 1299 de SEQ ID n°: 1, (ii) la parte codificante del polipéptido maduro de SEQ ID n°: 1 y/o (iii) una cadena complementaria de cualquiera de (i) y/o (ii) o variantes alélicas y subsecuencias de las mismas (Sambrook *et al.*, 1989, *supra*), tal y como se define en este caso. Alternativamente, la hibridación se lleva a cabo bajo condiciones de astringencia muy bajas o bajas.

[0097] Los polinucleótidos aislados se obtienen por (a) hibridación de una población de ADN bajo condiciones de astringencia muy bajas, bajas, medias, medio altas, altas o muy altas con: (i) los nucleótidos 67 a 1299 de SEQ ID n°: 1, (ii) la parte codificante del polipéptido maduro de SEQ ID n°: 1 y/o (iii) una cadena complementaria de cualquiera (i) y/o (ii) y (b) aislando el polinucleótido de hibridación que codifica un polipéptido con actividad de fitasa.

Constructos de ácido nucleico

[0098] La presente invención también se refiere a constructos de ácido nucleico que comprenden un polinucleótido aislado de la presente invención operativamente enlazado a una o más secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

[0099] Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de la presente invención se puede manipular de diferentes formas para proporcionar la expresión del polipéptido. La manipulación de la secuencia del polinucleótido antes de su inserción en un vector puede ser deseable o necesaria, dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para modificar secuencias polinucleótidas utilizando métodos de ADN recombinante son bien conocidas en la técnica.

[0100] La secuencia de control puede ser una secuencia del promotor apropiada, una secuencia de nucleótidos que es reconocida por una célula huésped para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. La secuencia del promotor contiene secuencias de control transcripcionales que median la expresión del polipéptido. El promotor puede ser cualquier secuencia de nucleótidos que muestre actividad transcripcional en la célula huésped de elección, incluyendo promotores mutantes, truncados e híbridos, y se pueden obtener a partir de genes que codifican polipéptidos intracelulares o extracelulares, ya sean heterólogos u homólogos de la célula huésped.

[0101] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácido nucleico de la presente invención, especialmente en una célula huésped bacteriana, son los promotores obtenidos del operón lac de *E. coli*, el gen de agarasa de *Streptomyces coelicolor* (dagA), el gen de levansucrasa de *Bacillus subtilis* (sacB), el gen de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (amyL), el gen de amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus* (amyM), el gen de alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (amyQ), el gen de penicilinas de *Bacillus licheniformis* (penP), los genes xylA y xylB de *Bacillus subtilis* y el gen de beta-lactamasa procariótica (Villa-Kamaroff *et al.*, 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 3727-3731), así como el promotor tac (DeBoer *et al.*, 1983, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80: 21-25). Más promotores se describen en "Useful proteins from recombinant bacteria" en Scientific American, 1980, 242: 74-94; y en Sambrook *et al.*, 1989, *supra*.

[0102] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácido nucleico de la presente invención en una célula huésped fúngica filamentosa son los promotores obtenidos de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, alfa-amilasa ácido estable de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger* o de *Aspergillus deawamori* (glaA), lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, isomerasa de triosa fosfato de *Aspergillus oryzae*, acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, amiloglucosidasa de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), *Fusarium venenatum Daria* (WO 00/56900), *Fusarium venenatum Quinn* (WO 00/56900), proteasa tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa I de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa IV de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, xilanasa I de *Trichoderma reesei*, xilanasa II de *Trichoderma reesei*, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei*, así como el promotor NA2- tpi (un híbrido de los promotores de los genes para alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* e isomerasa de triosa fosfato de *Aspergillus oryzae*); y promotores mutantes, truncados e híbridos de los mismos.

[0103] En un huésped de levadura, los promotores útiles se obtienen a partir de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), galactoquinasa de *Saccharomyces cerevisiae* (GAL1), dehidrogenasa de dehidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato de alcohol de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH1, ADH2/GAP) triosa fosfato isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae* (TPI), metalotionina de *Saccharomyces cerevisiae* (CUP1), 3-fosfogliceratoquinasa de *Saccharomyces cerevisiae* y oxidasa de alcohol *Pichia pastoris* (AOX1). Otros promotores útiles para células huésped de levadura están descritos por Romanos *et al.*, 1992, Yeast 8: 423-488.

[0104] La secuencia de control también puede ser una secuencia terminadora de transcripción adecuada, una secuencia reconocida por una célula huésped para terminar la transcripción. La secuencia terminadora se enlaza operativamente al 3' terminal de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Cualquier terminador que sea funcional en la célula huésped de elección se puede utilizar en la presente invención.

[0105] Los terminadores preferidos para células huésped fúngicas filamentosas se obtienen de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, sintasa de antranilato de *Aspergillus nidulans*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger* y proteasa tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.

[0106] Los terminadores preferidos para células huésped de levadura se obtienen a partir de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, citocromo C de *Saccharomyces cerevisiae* (CYC1) y gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros terminadores útiles para células huésped de levadura están descritos por Romanos *et al.*, 1992, *supra*.

[0107] La secuencia de control puede ser también una secuencia líder adecuada, una región no traducida de un ARNm que es importante para la traducción por la célula huésped. La secuencia líder se enlaza operativamente al 5' terminal de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Cualquier secuencia líder que sea funcional en la célula huésped de elección se puede utilizar en la presente invención.

[0108] La secuencia de control también puede ser una secuencia líder adecuada, una región no traducida de un ARNm que es importante para la traducción por la célula huésped. La secuencia líder se enlaza operativamente al 5' terminal de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Cualquier secuencia líder que sea funcional en la célula huésped de elección se puede utilizar en la presente invención.

- [0109] Los líderes preferidos para células huésped fúngicas filamentosas se obtienen de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.
- 5 [0110] Los líderes adecuados para células huésped de levadura se obtienen a partir de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae* y alcohol dehidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH2/GAP).
- 10 [0111] La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia operativamente enlazada al 3' terminal de la secuencia de nucleótidos y que, cuando se transcribe, es reconocida por la célula huésped como una señal para añadir residuos de poliadenosina para ARNm transcrito. Cualquier secuencia de poliadenilación que sea funcional en la célula huésped de elección se puede utilizar en la presente invención.
- 15 [0112] Las secuencias de poliadenilación preferidas para células huésped fúngicas filamentosas se obtienen a partir de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, sintasa de antranilato de *Aspergillus nidulans*, proteasa tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* y alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*.
- 20 [0113] Las secuencias de poliadenilación útiles para células huésped de levadura están descritas por Guo y Sherman, 1995, *Molecular Cellular Biology* 15: 5983-5990.
- [0114] La secuencia de control también pueden ser una región de codificación de péptido señal que codifica para una secuencia de aminoácidos enlazados al amino terminal de un polipéptido y que dirige el polipéptido codificado en la vía secretora de la célula. El extremo 5' de la secuencia codificante de la secuencia de nucleótidos puede contener intrínsecamente una región de codificación de péptido señal naturalmente enlazada en el marco de lectura de traducción al segmento de la región de codificación que codifica el polipéptido segregado. Alternativamente, el extremo 5' de la secuencia codificante puede contener una región codificante del péptido señal que sea foránea a la secuencia codificante. La región codificante del péptido señal foráneo puede ser requerida donde la secuencia codificante no contenga naturalmente una región codificante del péptido señal. Alternativamente, la región codificante del péptido señal foráneo puede simplemente reemplazar la región codificante del péptido señal natural para mejorar la secreción del polipéptido. No obstante, cualquier región codificante del péptido señal que dirija el polipéptido expresado en la vía secretora de una célula huésped de elección se puede utilizar en la presente invención.
- 25 [0115] Las regiones codificantes del péptido señal efectivas para células huésped bacterianas son las regiones codificantes del péptido señal obtenidas de los genes para amilasa maltogénica de *Bacillus* NCIB 11837, alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, subtilisina de *Bacillus licheniformis*, beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis*, proteasas neutras de *Bacillus stearothermophilus* (nprT, nprS, nprM) y *Bacillus subtilis* prsA. Más péptidos señal están descritos por Simonen y Palva, 1993, *Microbiological Reviews* 57: 109-137.
- 30 [0116] Las regiones codificantes del péptido señal efectivas para células huésped fúngicas filamentosas son las regiones codificantes del péptido señal obtenidas de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, amilasa neutra de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, celulasa de *Humicola insolens* y lipasa *Humicola*.
- 35 [0117] Los péptidos señal útiles para células huésped de levadura se obtienen de los genes para alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae* e invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otras regiones codificantes del péptido señal útiles están descritas por Romanos *et al.*, 1992, *supra*, y por Xiong *et al.* en *Journal of Applied Microbiology* 2005, 98, 418-428.
- 40 [0118] En un aspecto preferido, la región codificante del péptido señal son los nucleótidos del 1 al 66 de SEQ ID n°: 1, que codifican los aminoácidos 1 a 22 de SEQ ID n°: 2. En otro aspecto preferido, la región codificante del péptido señal son los nucleótidos del 1 al 66 de SEQ ID n°: 3, que codifican los aminoácidos 1 a 22 de SEQ ID n°: 4.
- 45 [0119] La secuencia de control también puede ser una región codificante de propéptidos que codifica para una secuencia de aminoácidos situada en el amino terminal de un polipéptido. El polipéptido resultante se conoce como un propolipéptido o propolipéptido (o un zimógeno en algunos casos). Un propolipéptido generalmente es inactivo y se puede convertir en un polipéptido maduro activo por escisión autocatalítica o catalítica del propéptido del propolipéptido. La región codificante del propéptido se puede obtener a partir de los genes para proteasa alcalina de *Bacillus subtilis* (aprE), proteasa neutra de *Bacillus subtilis* (nprT), alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei* y lacasa de *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836).
- 50 [0120] Cuando tanto las regiones del péptido señal como las del propéptido están presentes en el amino término de un polipéptido, la región del propéptido se sitúa junto al amino terminal de un polipéptido y la región del péptido señal se sitúa junto al amino término de la región del propéptido.
- 55
- 60
- 65

[0121] También puede ser conveniente añadir secuencias reguladoras que permitan la regulación de la expresión del polipéptido con respecto al crecimiento de la célula huésped. Ejemplos de sistemas reguladores son los que hacen que la expresión del gen se active o desactive en respuesta a un estímulo químico o físico, incluyendo la presencia de un compuesto regulador. Los sistemas reguladores en sistemas procarióticos incluyen los sistemas operadores lac, tac y trp. En levadura, se puede utilizar el sistema ADH2 o sistema GAL1. En hongos filamentosos, se puede utilizar el promotor de alfa-amilasa TAKA, el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae* como secuencias reguladoras. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son las que permiten la amplificación del gen.

10 Vectores de expresión

[0122] La presente invención también se refiere a vectores de expresión recombinantes que comprenden un polinucleótido de la presente invención, un promotor y señales de parada traduccionales y transcripcionales. Las diferentes secuencias de ácido nucleico y de control anteriormente descritas se pueden unir entre sí para producir un vector de expresión recombinante que pueda incluir uno o más sitios de restricción adecuados para permitir la inserción o la sustitución de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipeptídico en tales sitios. Alternativamente, una secuencia de nucleótidos de la presente invención se puede expresar mediante la inserción de la secuencia de nucleótidos o un constructo de ácido nucleico que comprende la secuencia en un vector apropiado para la expresión. Al crear el vector de expresión, la secuencia codificante está localizada en el vector de tal modo que la secuencia codificante está operativamente enlazada con las secuencias de control apropiadas para la expresión.

[0123] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (p. ej., un plásmido o virus) que se pueda someter convenientemente a procedimientos de ADN recombinante y que pueda provocar la expresión de la secuencia de nucleótidos. La elección del vector dependerá típicamente de la compatibilidad del vector con la célula huésped en la que debe introducirse el vector. Los vectores pueden ser plásmidos circulares cerrados o lineales.

[0124] El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula huésped, se integra en el genoma y se replica junto con el(los) cromosoma(s) en el(los) que se ha integrado. Además se puede utilizar un único vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ADN total que se debe introducir en el genoma de la célula huésped o un transposón.

[0125] Los vectores de la presente invención preferiblemente contienen uno o más marcadores seleccionables que permiten seleccionar de forma fácil las células transformadas. Un marcador seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia biocida o vírica, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos y similares.

[0126] Un gen condicionalmente esencial puede funcionar como un marcador seleccionable no antibiótico. Ejemplos no limitativos de marcadores seleccionables no antibióticos condicionalmente esenciales bacterianos son los genes dal de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* u otros bacilos, que sólo son esenciales cuando la bacteria se cultiva en ausencia de alanina-D. También los genes que codifican enzimas implicados en la producción de UDP-galactosa pueden funcionar como marcadores condicionalmente esenciales en una célula cuando la célula se cultiva en presencia de galactosa o en un medio que da lugar a la presencia de galactosa. Ejemplos no limitativos de tales genes son los de *B. subtilis* o *B. licheniformis* que codifican fosforilasa dependiente de UTP (EC 2.7.7.10), uridililtransferasa dependiente de UDP-glucosa (EC 2.7.7.12) o epimerasa UDP-galactosa (EC 5.1.3.2). También se puede usar un gen de isomerasa de xilosa tal como xylA de bacilos como marcadores seleccionables en células cultivadas en el medio mínimo con xilosa como única fuente de carbono. Los genes necesarios para utilizar gluconato, gntK, y gntP también pueden usarse como marcadores seleccionables en células cultivadas en el medio mínimo con gluconato como única fuente de carbono. Otros ejemplos de genes condicionalmente esenciales se conocen en la técnica. Marcadores seleccionables antibióticos confieren resistencia antibiótica a antibióticos tales como ampicilina, canamicina, cloranfenicol; eritromicina, tetraciclina, neomicina, higromicina o metotrexato.

[0127] Los marcadores adecuados para las células huésped de levadura son ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 y URA3. Los marcadores seleccionables para su uso en una célula huésped fúngica filamentosa incluyen, entre otros, amdS (acetamidasa), argB (ornitina-carbamoiltransferasa), bar (fosfinotricina acetiltransferasa), hph (higromicina fosfotransferasa), niaD (nitrito reductasa), pyrG (orotidina-5'-fosfato descarboxilasa), sC (sulfato adeniltransferasa) y trpC (antranilato sintasa) así como equivalentes de los mismos. Se prefieren para su uso en una célula de *Aspergillus* los genes amdS y pyrG de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y el gen bar de *Streptomyces hygroscopicus*.

[0128] Los vectores de la presente invención preferiblemente contienen un elemento(s) que permite(n) la integración del vector en el genoma de la célula huésped o la replicación autónoma del vector de la célula independiente del genoma.

[0129] Para la integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede depender la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido o de cualquier otro elemento del vector para la integración en el genoma mediante recombinación homóloga o no homóloga. Alternativamente, el vector puede contener secuencias de nucleótidos

adicionales para dirigir la integración por recombinación homóloga en el genoma de la célula huésped en una ubicación(es) precisa(s) del(los) cromosoma(s). Para aumentar la probabilidad de integración en una ubicación precisa, los elementos integracionales deberían contener preferiblemente un número suficiente de ácidos nucleicos, tal como de 100 a 10.000 pares de bases, preferiblemente de 400 a 10 000 pares de bases y de la forma más preferible de 800 a 10.000 pares de bases, que tienen un alto grado de identidad con la secuencia objetivo correspondiente para mejorar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos integracionales pueden ser cualquier secuencia que sea homóloga de la secuencia objetivo en el genoma de la célula huésped. Además, los elementos integracionales pueden ser secuencias de nucleótidos no codificantes o codificantes. Por otro lado, el vector se puede integrar en el genoma de la célula huésped por recombinación no homóloga.

[0130] Para la replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación que permita al vector replicarse de manera autónoma en la célula huésped en cuestión. El origen de replicación puede ser cualquier replicador plásmido que medie la replicación autónoma que funciona en una célula. El término "origen de replicación" o "replicador plásmido" se define en este caso como una secuencia de nucleótidos que permite a un plásmido o vector replicarse *in vivo*.

[0131] Ejemplos de orígenes bacterianos de replicación son los orígenes de replicación de plásmidos pBR322; pUC19; pACYC177, y pACYC184 que permiten la replicación en *E. coli*, y pUB110; pE194; pTA1060, y pAMB1 que permiten la replicación en *Bacillus*.

[0132] Ejemplos de orígenes de replicación para el uso en una célula huésped de levadura son los orígenes de replicación de 2 micrones, ARS1, ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3 y la combinación de ARS4 y CEN6.

[0133] Ejemplos de orígenes de replicación útiles en una célula fúngica filamentosa son AMA1 y ANS1 (Gems *et al.*, 1991, Gene 98:61-67; Cullen *et al.*, 1987, Nucleic Acids Research 15: 9163-9175; WO 00/24883). El aislamiento del gen AMA1 y la construcción de plásmidos o vectores que comprenden el gen se puede realizar de acuerdo con los métodos descritos en WO 00/24883.

[0134] Se puede insertar más de una copia de un polinucleótido de la presente invención en la célula huésped para aumentar la producción del producto genético. Se puede obtener un aumento en el número de copias del polinucleótido integrando al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped o incluyendo un gen marcador seleccionable amplificable con el polinucleótido donde las células que contienen copias amplificadas del gen marcador seleccionable, y, por lo tanto, copias adicionales del polinucleótido, se pueden seleccionar cultivando las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

[0135] Los procedimientos usados para enlazar los elementos anteriormente descritos para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención son conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

Células huésped

[0136] La presente invención también se refiere a células huésped recombinantes, que comprenden un polinucleótido de la presente invención, que se usan ventajosamente en la producción recombinante de los polipéptidos. Un vector que comprende un polinucleótido de la presente invención se introduce en una célula huésped de modo que el vector se mantenga como un integrante cromosómico o como un vector extracromosomal autoreplicante como se describe anteriormente. El término "célula huésped" abarca cualquier progenie de una célula madre que no sea idéntica a la célula madre debido a mutaciones que ocurren durante la replicación. La elección de una célula huésped en gran parte dependen del gen que codifica el polipéptido y su fuente.

[0137] La célula huésped puede ser un microorganismo unicelular, por ejemplo, un procarionta, o un microorganismo no unicelular, por ejemplo, un eucariota.

[0138] Los microorganismos unicelulares útiles son células bacterianas tales como bacterias Gram positivas que incluyen, entre otras, una célula de *Bacillus*, por ejemplo, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*; o una célula de *Streptomyces*, por ejemplo, *Streptomyces lividans* y *Streptomyces murinus*, o bacterias Gram negativas tales como *E. coli* y *Pseudomonas sp.* En un aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus* o de *Bacillus subtilis*. En otro aspecto preferido, la célula de *Bacillus* es un *Bacillus* alcalofílico.

[0139] La introducción de un vector en una célula huésped bacteriana puede efectuarse, por ejemplo, por transformación de protoplasto (véase, por ejemplo, Chang y Cohen, 1979, Molecular General Genetics 168: 111-115), uso de células competentes (véase, por ejemplo, Young y Spizizin, 1961, Journal of Bacteriology 81: 823-829 o Dubnau y Davidoff-Abelson, 1971, Journal of Molecular Biology 56: 209-221), electroporación (véase, por ejemplo, Shigekawa y

Dower, 1988, *Biotechniques* 6: 742-751) o conjugación (véase, por ejemplo, Koehler y Thorne, 1987, *Journal of Bacteriology* 169: 5771-5278).

[0140] La célula huésped también puede ser una eucariota, tal como una célula de mamífero, de insecto, vegetal o fúngica.

[0141] En un aspecto preferido, la célula huésped es una célula fúngica. "Hongos" como se utiliza en este caso incluye el filo *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* y *Zygomycota* (según la definición de Hawkswort *et al.*, en, Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8th edition, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, Reino Unido) al igual que el *Oomycota* (según se cita en Hawkswort *et al.*, 1995, *supra*, página 171) y todos los hongos mitospóricos (Hawkswort *et al.*, 1995, *supra*).

[0142] En una forma de realización más preferida, la célula huésped fúngica es una célula de levadura. "Levadura", como se utiliza en este caso, incluye levadura ascosporógena (*Endomycetales*), levadura basidioesporogénea y levadura de los hongos imperfectos (*Blastomycetes*). Dado que la clasificación de levaduras puede cambiar en el futuro, para los fines de esta invención, la levadura debe definirse como se describe en *Biology and Activities of Yeast* (Skinner, F.A., Passmore, S.M., and Davenport, R.R., eds, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series No. 9, 1980).

[0143] En un aspecto incluso más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o de *Yarrowia*.

[0144] En un aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis* o célula de *Saccharomyces oviformis*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Kluyveromyces lactis*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Yarrowia lipolytica*.

[0145] En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica es una célula fúngica filamentosa. Los "hongos filamentosos" incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión *Eumycota* y *Oomycota* (según se define por Hawkswort *et al.*, 1995, *supra*). Los hongos filamentosos se caracterizan generalmente por una pared micelial compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo es por elongación hifal y el catabolismo de carbono es estrictamente aeróbico. En cambio, el crecimiento vegetativo por levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* es por injerto de un talo unicelular y el catabolismo de carbono puede ser fermentativo.

[0146] En un aspecto incluso más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filobasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trametes* o *Trichoderma*.

[0147] En un aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides* o *Fusarium venenatum*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de cepa de *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis pannocinta*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa*, o *Ceriporiopsis subvermispora*, *Coprinus cinereus*, *Coriolus hirsutus*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus eryngii*, *Thielavia terrestris*, *Trametes villosa*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*.

[0148] Las células fúngicas se pueden transformar mediante un proceso que implica la formación de protoplasto, la transformación de los protoplastos y la regeneración de la pared celular de una manera conocida *per se*. Los procedimientos adecuados para la transformación de las células huésped de *Aspergillus* y *Trichoderma* se describen en la EP 238 023 y en Yelton *et al.*, 1984, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 81: 1470-1474. Los métodos adecuados para transformar especies de *Fusarium* son descritos por Malardier *et al.*, 1989, *Gene* 78: 147-156 y WO 96/00787. La levadura se puede transformar usando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, en Abelson, J.N. and Simon, M.I., editors, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Volume 194*, pp 182-187, Academic Press, Inc., New York; Ito *et al.*, 1983, *Journal of Bacteriology* 153: 163; y Hinnen *et al.*, 1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 75: 1920.

Métodos de producción

[0149] La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención, que comprende: (a) cultivo de una célula, que en su forma de tipo salvaje es capaz de producir el polipéptido, bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido. Preferiblemente, la célula es del género *Citrobacter* y más preferiblemente *Citrobacter braakii*.

[0150] La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención, que comprende: (a) cultivo de una célula huésped bajo condiciones propicias para la producción del polipeptídico; y (b) recuperación del polipéptido.

[0151] La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención, que comprende: (a) cultivo una célula huésped bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido, donde la célula huésped comprende una secuencia de nucleótidos mutante con al menos una mutación en la región codificante del polipéptido maduro de cualquiera de las SEQ ID n°: 1 y 3, donde la secuencia del nucleótido mutante codifica un polipéptido que consiste en los aminoácidos 1 a 411 de cualquiera de las SEQ ID n°: 2 y 4, y (b) recuperación del polipéptido.

[0152] En los métodos de producción de la presente invención, las células se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción del polipéptido usando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula se puede cultivar por cultivo en matraz de agitación y fermentación a gran escala o pequeña escala (incluida la fermentación continua, de lote, de lote alimentado o de estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales realizados en un medio adecuado y bajo condiciones que permitan que el polipéptido sea expresado y/o aislado. El cultivo se desarrolla en un medio nutritivo adecuado que comprende fuentes de nitrógeno y de carbono y sales inorgánicas, utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Los medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según composiciones publicadas (p. ej., en catálogos de la *American Type Culture Collection*). Si el polipéptido se segrega en el medio nutritivo, el polipéptido se puede recuperar directamente del medio. Si el polipéptido no está segregado, se puede recuperar de lisatos celulares.

[0153] Los polipéptidos se pueden detectar usando métodos conocidos en la técnica que son específicos para los polipéptidos. Estos métodos de detección pueden incluir el uso de anticuerpos específicos, la formación de un producto polipeptídico o la desaparición de un sustrato polipeptídico. Por ejemplo, se puede utilizar un ensayo polipeptídico para determinar la actividad del polipéptido como se describe en este caso.

[0154] El polipéptido resultante se puede recuperar utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido se puede recuperar del medio nutritivo por procedimientos convencionales, incluidos, entre otros, centrifugado, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación.

[0155] Los polipéptidos de la presente invención se pueden purificar mediante varios procedimientos conocidos en la técnica, incluidos, entre otros, cromatografía (p. ej., de intercambio iónico, de afinidad, hidrofóbica, de cromatofoco y de exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (p. ej., isoelectroenfoque preparativo), solubilidad diferencial (p. ej., precipitación de sulfato amónico), SDS-PAGE o extracción (véase, por ejemplo, *Protein Purification*, J.-C. Janson and Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989).

Plantas transgénicas

[0156] La presente invención también se refiere a una planta transgénica, parte de planta o célula vegetal que ha sido transformada con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad de fitasa de la presente invención para expresar y producir el polipéptido en cantidades recuperables. El polipéptido se puede recuperar a partir de la planta o de la parte de planta. Alternativamente, la planta o la parte de planta que contiene el polipéptido recombinante se puede utilizar como tal para mejorar la calidad de un alimento o pienso, por ejemplo, mejorar el valor nutricional, la palatabilidad y las propiedades reológicas, o para destruir un factor antinutritivo.

[0157] En una forma de realización particular, el polipéptido está concebido para las vacuolas de almacenamiento de endospermo en semillas. Este se puede obtener sintetizándolo como un precursor con un péptido señal adecuado, véase Horvath *et al.* en PNAS, Feb. 15, 2000, vol. 97, no. 4, p. 1914-1919.

[0158] La planta transgénica puede ser dicotiledónea (un dicot) o monocotiledónea (un monocot) o variantes creadas genéticamente de las mismas. Ejemplos de plantas monocotiledóneas son hierbas, tales como grama de prado (pasto azul, *Poa*), hierba forrajera tal como *Festuca*, *Lolium*, césped templado, tal como *Agrostis* y cereales, por ejemplo, trigo, avena, centeno, cebada, arroz, sorgo, triticale (estabilizado híbrido de trigo (*Triticum*) y centeno (*Secale*) y maíz (mazorca). Ejemplos de plantas dicotiledóneas son tabaco, leguminosas, tales como girasol (*Helianthus*), algodón (*Gossypium*), altramuces, patata, remolacha azucarera, guisante, judía y semilla de soja y plantas crucíferas (familia *Brassicaceae*), tales como coliflor, semilla de colza y el organismo modelo cercanamente relacionado *Arabidopsis thaliana*. Las plantas con bajo contenido en fitato según se describen por ejemplo en la patente estadounidense n°: 5 689 054 y en la patente estadounidense n°: 6 111 168 son ejemplos de plantas creadas genéticamente.

[0159] Ejemplos de partes de planta son tallo, callo, hojas, raíz, frutas, semillas y tubérculos, al igual que los tejidos individuales que comprenden estas partes, por ejemplo epidermis, mesófilo, parénquima, tejidos vasculares y meristemas. También se consideran parte de una planta los compartimentos de célula vegetal específicos tales como cloroplasto, apoplasto, mitocondria, vacuola, peroxisomas y citoplasma. Además, cualquier célula vegetal, cualquiera que sea el origen del tejido, se considera una parte de la planta. Asimismo, las partes de planta tales como tejidos específicos y células aisladas para facilitar la utilización de la invención también se consideran partes de planta, por ejemplo embriones, endospermas, aleurona y revestimientos de semillas.

[0160] También se incluye dentro del campo de la presente invención la progenie de tales plantas, partes de planta y células vegetales.

[0161] La planta transgénica o célula vegetal que expresa un polipéptido de la presente invención se puede construir conforme a métodos conocidos en la técnica. En resumen, la planta o célula vegetal se construye incorporando uno o más constructos de expresión que codifican un polipéptido de la presente invención en el genoma huésped de la planta y propagando la planta o célula vegetal resultante modificada en una planta o célula vegetal transgénica.

[0162] Convenientemente, el constructo de expresión es un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido de la presente invención operativamente enlazado con secuencias reguladoras apropiadas necesarias para la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos en la planta o parte de planta elegida. Además, el constructo de expresión puede comprender un marcador seleccionable útil para identificar las células huésped en las que se ha integrado el constructo de expresión y secuencias de ADN necesarias para introducir el constructo en la planta en cuestión (esto depende del método de introducción de ADN que se utilice).

[0163] La elección de secuencias reguladoras, tales como secuencias de promotor y de terminador y opcionalmente secuencias de señal o de tránsito se determina, por ejemplo, basándose en cuándo, dónde y cómo se desea expresar el polipéptido. Por ejemplo, la expresión del gen que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser constitutiva o inducible, o puede ser desarrollable, específica de fase o tejido y el producto genético puede estar dirigido a un compartimento celular, tejido o parte de planta específico, tal como semillas u hojas. Las secuencias reguladoras son, por ejemplo, descritas por Tague *et al.*, 1988, *Plant Physiology* 86: 506.

[0164] Para expresión constitutiva pueden utilizarse los siguientes promotores: el promotor 35S-CaMV (Franck *et al.*, 1980, *Cell* 21: 285-294), la ubiquitina de maíz 1 (Christensen AH, Sharrock RA and Quail, 1992, Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation) o el promotor de actina de arroz 1 (Plant Mo. Biol. 18, 675-689.; Zhang W, McElroy D. and Wu R 1991, Analysis of rice Act1 5' region activity in transgenic rice plants. *Plant Cell* 3, 1155-1165). Los promotores específicos de un órgano pueden ser, por ejemplo, un promotor de tejidos sumidero de almacenamiento tales como semillas, tubérculos de patata y frutas (Edwards & Coruzzi, 1990, *Ann. Rev. Genet.* 24: 275-303), o de tejidos sumidero metabólicos tales como meristemas (Ito *et al.*, 1994, *Plant Mol. Biol.* 24: 863-878), un promotor específico de semilla tal como el promotor de glutelina, prolamina, globulina o de albúmina de arroz (Wu *et al.*, 1998, *Plant and Cell Physiology* 39: 885-889), un promotor de *Vicia faba* de la legúmina B4 y el gen de proteína de semilla desconocido de *Vicia faba* (Conrad *et al.*, 1998, *Journal of Plant Physiology* 152: 708-711), un promotor de una proteína de cuerpo oleoso de semilla (Chen *et al.*, 1998, *Plant and Cell Physiology* 39: 935-941), el promotor de la proteína de almacenamiento napA de *Brassica napus* o cualquier otro promotor específico de semilla conocido en la técnica, por ejemplo, como se describe en WO 91/14772. Además, el promotor puede ser un promotor específico de hoja tal como el promotor de rbcS de arroz o tomate (Kyojuka *et al.*, 1993, *Plant Physiology* 102: 991-1000), el promotor del gen de la adenina metiltransferasa del virus de *Chlorella* (Mitra and Higgins, 1994, *Plant Molecular Biology* 26: 85-93), o el promotor del gen aldP de arroz (Kagaya *et al.*, 1995, *Molecular and General Genetics* 248: 668-674) o un promotor inducible por lesiones tal como el promotor de patata pin2 (Xu *et al.*, 1993, *Plant Molecular Biology* 22: 573-588). Asimismo, el promotor puede ser inducible por tratamientos abióticos tales como temperatura, sequía o alteraciones en la salinidad o inducible por sustancias aplicadas de forma exógena que activan el promotor, por ejemplo etanol, estrógenos, hormonas vegetales tales como etileno, ácido abscísico, ácido giberélico y/o metales pesados.

[0165] También se puede usar un elemento intensificador del promotor para conseguir mayor expresión del polipéptido en la planta. Por ejemplo, el elemento intensificador del promotor puede ser un intrón que se coloca entre el promotor y la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención. Por ejemplo, Xu *et al.*, 1993, *supra* describen el uso del primer intrón del gen de actina 1 de arroz para mejorar la expresión.

[0166] Todavía más, el uso del codón se puede optimizar para que las especies de planta en cuestión mejoren la expresión (véase Horvath *et al.*, mencionado anteriormente).

[0167] El gen marcador seleccionable y cualquier otra parte del constructo de expresión se puede elegir de los disponibles en la técnica.

[0168] El constructo de ácido nucleico se incorpora al genoma de la planta según técnicas convencionales conocidas en la técnica, incluyendo la transformación mediada por *Agrobacterium*, la transformación mediada por virus, la microinyección, el bombardeo de partícula, la transformación biolística y la electroporación (Gasser *et al.*, 1990, *Science* 244: 1293; Potrykus, 1990, *Bio/Technology* 8: 535; Shimamoto *et al.*, 1989, *Nature* 338: 274).

[0169] Actualmente, la transferencia de genes mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es el método elegido para generar dicotiledóneas transgénicas (para obtener un resumen, véase Hooykas y Schilperoort, 1992, Plant Molecular Biology 19: 15-38), y también puede usarse para transformar monocotiledóneas, aunque frecuentemente se utilizan más otros métodos de transformación para estas plantas. Actualmente, el método elegido para generar monocotiledóneas transgénicas, complementando el método de *Agrobacterium*, es el bombardeo de partículas (partículas de oro o de tungsteno microscópicas revestidas con ADN transformante) de callos embrionarios o embriones en desarrollo (Christou, 1992, Plant Journal 2: 275-281; Shimamoto, 1994, Current Opinion Biotechnology 5: 158-162; Vasil *et al.*, 1992, Bio/Technology 10: 667-674). Un método alternativo para transformar monocotiledóneas se basa en la transformación de protoplasto tal y como describe por Omirulleh *et al.*, 1993, Plant Molecular Biology 21: 415-428.

[0170] Tras la transformación, los transformantes que hayan incorporado el constructo de expresión se seleccionan y se regeneran en plantas enteras según métodos bien conocidos en la técnica. Frecuentemente, el procedimiento de transformación se diseña para la eliminación selectiva de genes de selección, bien durante la regeneración bien en las siguientes generaciones usando, por ejemplo, cotransformación con dos constructos de T-ADN separados o escisión específica de sitio del gen de selección por una recombinasa específica.

[0171] La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención que comprende: (a) cultivo de una planta transgénica o una célula vegetal que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con actividad de fitasa de la presente invención bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.

Animales transgénicos

[0172] La presente invención también se refiere a un animal transgénico no humano y productos o elementos del mismo, como por ejemplo líquidos biológicos tales como leche y sangre, órganos, carne y células animales. Las técnicas para expresar proteínas, por ejemplo en células mamíferas, son conocidas en la técnica, véase por ejemplo el manual Protein Expression: A Practical Approach, Higgins and Hames (eds), Oxford University Press (1999) y los otros tres manuales de esta serie sobre transcripción de genes, procesamiento del RNA y procesamiento postraduccional. En términos generales, para preparar un animal transgénico, las células seleccionadas de un animal seleccionado se transforman con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con actividad de fitasa de la presente invención para expresar y producir el polipéptido. El polipéptido se puede recuperar del animal, por ejemplo, de la leche de los animales hembra, o el polipéptido se puede expresar para el beneficio del mismo animal, por ejemplo, para ayudar al animal en su digestión. Se ofrecen ejemplos de animales más adelante en la sección titulada "Alimento para animales".

[0173] Para producir un animal transgénico con el propósito de recuperar el polipéptido de la leche del animal, se puede insertar un gen que codifica el polipéptido en los óvulos fertilizados de un animal en cuestión, por ejemplo usando un vector de expresión transgénico que comprende un promotor de proteína láctea adecuado y el gen que codifica el polipéptido. El vector de expresión transgénico se microinyecta en los óvulos fertilizados y preferiblemente está permanentemente integrado en el cromosoma. Una vez que el óvulo comienza a crecer y a dividirse, el potencial embrión se implanta en una madre subrogada y los animales que portan el transgen son identificados. El animal resultante puede después multiplicarse por cultivo convencional. El polipéptido se puede purificar a partir de la leche del animal, véase, por ejemplo, Meade, H.M. *et al.* (1999): Expression of recombinant proteins in the milk of transgenic animals, Gene expression systems: Using nature for the art of expression. J. M. Fernandez and J. P. Hoeffler (eds.), Academic Press.

[0174] De forma alternativa, para producir un animal transgénico no humano que porte en el genoma de sus células somáticas y/o germinales una secuencia de ácidos nucleicos que incluya un constructo de transgen heterólogo incluyendo un transgen que codifica el polipéptido, el transgen se puede enlazar operativamente a una primera secuencia reguladora para expresión específica de glándula salival del polipéptido, como se describe en la WO 00/064247.

Composiciones y usos

[0175] En otros aspectos más, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden un polipéptido de la presente invención, así como métodos de uso de éstos.

[0176] Las composiciones polipeptídicas se pueden preparar conforme a los métodos conocidos en la técnica y pueden ser en forma de líquido o de una composición seca. Por ejemplo, la composición polipeptídica puede ser en forma de granulados o microgranulados. El polipéptido que se debe incluir en la composición se puede estabilizar según los métodos conocidos en la técnica.

[0177] La fitasa de la invención se puede usar para degradar, en cualquier contexto industrial, por ejemplo, fitato, ácido fítico y/o mono-, di-, tri-, tetra- y/o penta-fosfatos de mioinositol. Es bien conocido que las fracciones de fosfato de estos compuestos quelan cationes divalentes y trivalentes tales como iones metálicos, es decir, los iones nutricionalmente

esenciales de calcio, hierro, zinc y magnesio así como los oligoelementos manganeso, cobre y molibdeno. Además, el ácido fítico también une hasta cierto punto proteínas por interacción electrostática.

5 [0178] Por consiguiente, los usos preferidos de los polipéptidos de la invención son en preparaciones de alimentos para animales (alimentación humana incluida) o en aditivos para este tipo de preparaciones.

10 [0179] En una forma de realización particular, el polipéptido de la invención se puede usar para mejorar el valor nutricional de un alimento para animales. Ejemplos no limitativos de mejora del valor nutricional de alimentos para animales (alimentación humana incluida) son: mejora de la digestibilidad del alimento; estimulación del crecimiento del animal; mejora de la utilización del alimento; mejora de la biodisponibilidad de proteínas; aumentando del nivel de fosfato digerible; mejora de la liberación y/o degradación de fitato; mejora de la biodisponibilidad de oligoelementos; mejora de la biodisponibilidad de macrominerales; eliminación de la necesidad de añadir fosfato, oligoelementos y/o macrominerales suplementarios; y/o mejora de la calidad de la capa del óvulo. Por lo tanto, se aumenta el valor nutricional del alimento y el índice de crecimiento y/o de aumento de peso y/o de conversión alimentaria (es decir, el peso de alimento ingerido con respecto al aumento de peso) del animal se puede mejorar.

15 [0180] Además, el polipéptido de la invención se puede usar para reducir el nivel de fitato de abono.

20 Animales, alimento para animales y aditivos para alimento para animales

25 [0181] El término animal incluye todos los animales, incluidos los seres humanos. Ejemplos de animales son animales no rumiantes y rumiantes. Los animales rumiantes incluyen, por ejemplo, animales tales como ovejas, cabras, caballos y ganado bovino, por ejemplo ganado bovino para carne, vacas y terneros jóvenes. En una forma de realización particular, el animal es un animal no rumiante. Los animales no rumiantes incluyen animales monogástricos, por ejemplo cerdos o puercos (incluyendo, entre otros, lechones, cerdos en crecimiento y cerdas); aves tales como pavos, patos y pollos (incluyendo, entre otros, pollos de engorde y gallinas ponedoras); terneros jóvenes; y peces (incluyendo, entre otros, salmón, trucha, tilapia, siluro y carpa; y crustáceos (incluyendo, entre otros, gambas y langostinos).

30 [0182] El término alimento o composición alimenticia se refiere a cualquier compuesto, preparación, mezcla o composición adecuada o concebida para la ingesta por parte de un animal.

[0183] En el uso según la invención, el polipéptido se puede suministrar al animal antes, después o simultáneamente con la dieta. Se prefiere esto último.

35 [0184] En una forma de realización particular, el polipéptido, en la forma en la que se añade al alimento o cuando se incluye en un aditivo alimenticio, es substancialmente puro. En una forma de realización particular está bien definido. El término "bien definido" significa que la preparación de fitasa es al menos 50% pura, como se determina por cromatografía de exclusión de tamaño (véase el Ejemplo 12 de la WO 01/58275). En otras formas de realización particulares la preparación de fitasa es al menos 60, 70, 80, 85, 88, 90, 92, 94, o al menos 95% pura, como se determina por este método.

40 [0185] Una preparación polipeptídica substancialmente pura y/o bien definida es ventajosa. Por ejemplo, es mucho más fácil dosificar correctamente al alimento un polipéptido que está esencialmente libre de interferir o contaminar otros polipéptidos. El término dosificar correctamente se refiere, en particular, al objetivo de obtener resultados constantes y coherentes y a la capacidad de optimizar la dosificación basada en el efecto deseado.

[0186] Para el uso en el alimento para animales, no obstante, el polipéptido de fitasa de la invención no necesita ser tan puro; puede por ejemplo incluir otros polipéptidos, en cuyo caso éste se denomina preparación de fitasa.

50 [0187] La preparación de fitasa se puede: (a) adicionar directamente al alimento (o usar directamente en un proceso de tratamiento de proteínas) o (b) se puede usar en la producción de una o más composiciones intermedias tales como aditivos alimenticios o premezclas que posteriormente se añaden al alimento (o se usan en un proceso de tratamiento). El grado de pureza descrito anteriormente se refiere a la pureza de la preparación de polipéptido original, si se usa según los puntos (a) o (b) anteriores.

55 [0188] Las preparaciones polipeptídicas con purezas de este orden de magnitud se pueden obtener, en particular, usando métodos recombinantes de producción, mientras que no se obtienen tan fácilmente y están sujetas a una variación de lote a lote cuando el polipéptido se produce por métodos de fermentación tradicional.

60 [0189] Tal preparación polipeptídica puede, por supuesto, mezclarse con otros polipéptidos.

[0190] El polipéptido se puede añadir al alimento en cualquier forma, bien sea un polipéptido relativamente puro o en mezcla con otros componentes concebidos para añadirlos a alimentos para animales, es decir, en forma de aditivos para alimentos para animales, tales como las llamadas premezclas para alimentos para animales.

65

[0191] En otro aspecto, la presente invención se refiere a composiciones para su uso en alimentos para animales, tales como alimento para animales y aditivos para alimento para animales, por ejemplo premezclas.

5 [0192] Además del polipéptido de la invención, los aditivos para alimentos para animales de la invención contienen al menos una vitamina liposoluble y/o al menos una vitamina hidrosoluble y/o al menos un oligoelemento. El aditivo alimenticio también puede contener al menos un macromineral.

10 [0193] Además, ingredientes aditivos alimenticios opcionales son los agentes colorantes, por ejemplo, carotenoides tales como beta-caroteno, astaxantina y luteína; compuestos aromáticos; estabilizadores; péptidos antimicrobianos; ácidos grasos poliinsaturados; especies generadoras de oxígeno reactivo; y/o al menos otro polipéptido seleccionado de entre fitasa (EC 3.1.3.8 o 3.1.3.26); xilanasa (EC 3.2.1.8); galactanasa (EC 3.2.1.89); alfa-galactosidasa (EC 3.2.1.22); proteasa (EC 3.4.-.-), fosfolipasa A1 (EC 3.1.1.32); fosfolipasa A2 (EC 3.1.1.4); lisofosfolipasa (EC 3.1.1.5); fosfolipasa C (3.1.4.3); fosfolipasa D (EC 3.1.4.4); amilasa tal como, por ejemplo, alfa-amilasa (EC 3.2.1.1); y/o beta-glucanasa (EC 3.2.1.4 o EC 3.2.1.6).

15 [0194] En una forma de realización particular estos otros polipéptidos están bien definidos (como se definen anteriormente para preparaciones de fitasa).

20 [0195] En una forma de realización particularmente preferida, la fitasa de la invención con un pH óptimo relativamente bajo se combina con al menos una fitasa con un pH óptimo más alto. Ejemplos preferidos de fitasas con pH óptimo más alto son fitasas de *Bacillus*, tales como las fitasas de *Bacillus licheniformis* y de *Bacillus subtilis*, así como derivados, variantes o fragmentos de los mismos con actividad de fitasa.

25 [0196] La fitasa de la invención también se puede combinar con otras fitasas, por ejemplo fitasas de ascomiceto tales como fitasas de *Aspergillus*, por ejemplo derivadas de *Aspergillus ficuum*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus awamori*; o fitasas de basidiomiceto, por ejemplo derivadas de *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, *Trametes pubescens* o *Paxillus involutus*; o derivados, fragmentos o variantes de los mismos que tienen actividad de fitasa.

30 [0197] Así, en formas de realización preferidas del uso en alimentos para animales de la invención y en formas de realización preferidas del aditivo para alimentos para animales y el alimento para animales de la invención, la fitasa de la invención se combina con tales fitasas.

35 [0198] Las fitasas de ascomiceto y de basidiomiceto anteriormente mencionadas, en particular la fitasa RONOZYME P derivada de *Peniophora lycii*, así como derivados, variantes y fragmentos de las mismas, también se pueden combinar con fitasas de *Bacillus*, en particular la fitasa de *B. licheniformis*, así como derivados, fragmentos o variantes de la misma, en particular para fines de alimentos para animales.

40 [0199] Ejemplos de péptidos antimicrobianos (AMPs) son CAP18, Leucocina A, Tritpticina, Protegrina-1, Tanatina, Defensina, Lactoferrina, Lactoferricina y Ovispirina tales como Novispirina (Robert Lehrer, 2000), Plectasinas y Estatinas, incluyendo los compuestos y polipéptidos descritos en la WO 03/044049 y la WO 03/048148, así como las variantes o fragmentos de los anteriores que retienen actividad antimicrobiana.

45 [0200] Ejemplos de polipéptidos antifúngicos (AFPs) son los péptidos de *Aspergillus giganteus* y de *Aspergillus niger*, así como variantes y fragmentos de los mismos que retienen actividad antifúngica, como se describe en la WO 94/01459 y la WO 02/090384.

[0201] Ejemplos de ácidos grasos poliinsaturados son los ácidos grasos poliinsaturados C18; C20 y C22, tales como ácido araquidónico, ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentanoico y ácido gamma-linoleico.

50 [0202] Ejemplos de especies generadoras de oxígeno reactivo son productos químicos tales como perborato, persulfato o percarbonato; y polipéptidos tal como una oxidasa, una oxigenasa o una sintetasa.

55 [0203] Por lo general las vitaminas liposolubles e hidrosolubles, así como los oligoelementos forman parte de la llamada premezcla destinada para la adición al alimento, mientras que los macrominerales se añaden al alimento normalmente por separado. Cualquiera de estos tipos de composición, cuando se enriquece con un polipéptido de la invención, es un aditivo para alimento para animales de la invención.

60 [0204] En una forma de realización particular, el aditivo para alimento para animales de la invención esta concebido para incluirlo (o prescribirlo como que debe incluirse) en dietas o alimentos para animales en niveles de 0,01 a 10,0%; más particularmente de 0,05 a 5,0%; o de 0,2 a 1,0% (% significa g de aditivo por 100 g de alimento). Esto es así en particular para premezclas.

[0205] A continuación se muestran unas listas no exclusivas de ejemplos de estos componentes:

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

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

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

Ejemplos de macrominerales son calcio, fósforo y sodio.

5

[0206] Los requisitos nutricionales de estos componentes (ejemplificados con aves de corral y lechones/cerdos) se catalogan en la Tabla A de la WO 01/58275. Requisito nutricional significa que estos componentes deberían proporcionarse en la dieta en las concentraciones indicadas.

10

[0207] Alternativamente, el aditivo para alimentos para animales de la invención comprende al menos uno de los componentes individuales especificados en la Tabla A de la WO 01/58275. Al menos uno significa cualquiera, uno o más de uno, o dos, o tres, o cuatro y así sucesivamente hasta los trece, o hasta los quince componentes individuales. Más específicamente, al menos un componente individual se incluye en el aditivo de la invención en la cantidad suficiente para proporcionar una concentración en el alimento dentro del intervalo indicado en la columna cuatro, o la columna cinco o la columna seis de Tabla A.

15

[0208] La presente invención también se refiere a composiciones de alimento para animales. Las composiciones de alimento o dietas para animales tienen un contenido relativamente alto de proteínas. Las dietas de las aves de corral y de los cerdos se pueden caracterizar de la manera indicada en la Tabla B de la WO 01/58275, columnas 2-3. Las dietas de los peces se pueden caracterizar de la manera indicada en la columna 4 de esta Tabla B. Además, tales dietas de los peces normalmente tienen un contenido de grasa cruda de 200-310 g/kg.

20

[0209] La WO 01/58275 corresponde a la US 09/779334 que se incorpora en la presente por referencia.

25

[0210] Una composición de alimento para animales según la invención tiene un contenido bruto de proteínas de 50-800 g/kg y además comprende al menos un polipéptido como se reivindica en este documento.

30

[0211] Además o alternativamente (al contenido bruto de proteína indicado anteriormente), la composición de alimento para animales de la invención tiene un contenido de energía metabolizable de 10-30 MJ/kg; y/o un contenido de calcio de 0,1-200 g/kg; y/o un contenido de fósforo disponible de 0,1-200 g/kg; y/o un contenido de metionina de 0,1-100 g/kg; y/o un contenido de metionina más cisteína de 0,1-150 g/kg; y/o un contenido de lisina de 0,5-50 g/kg.

35

[0212] En formas de realización particulares, el contenido de energía metabolizable, proteína cruda, calcio, fósforo, metionina, metionina más cisteína y/o lisina está dentro de cualquiera de los intervalos 2, 3, 4 o 5 de la Tabla B de la WO 01/58275 (R. 2-5).

40

[0213] La proteína cruda se calcula como nitrógeno (N) multiplicado por un factor 6,25, es decir proteína cruda (g/kg) = N (g/kg) x 6,25. El contenido de nitrógeno se determina por el método Kjeldahl (A.O.A.C., 1984, Official Methods of Analysis 14th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington DC).

45

[0214] La energía metabolizable se puede calcular basándose en la publicación del NRC Nutrient Requirements in Swine, Ninth revised edition 1988, Subcommittee on Swine Nutrition, Committee on Animal Nutrition, Board of Agriculture, National Research Council. National Academy Press, Washington, D.C., pp. 2-6, y la European Table of Energy Values for Poultry Feed-stuffs, Spelderholt centre for poultry research and extension, 7361 DA Beekbergen, The Netherlands. Grafisch bedrijf Ponsen & Iooijen bv, Wageningen. ISBN 90-71463-12-5.

50

[0215] El contenido dietético de calcio, fósforo disponible y aminoácidos en las dietas de animales completas se calcula sobre la base de las tablas alimentarias tales como Veevoedertabel 1997, gegevens over chemische samenstelling, verteerbaarheid en voederwaarde van voedermiddelen, Central Veevoederbureau, Runderweg 6, 8219 pk Lelystad. ISBN 90-72839-13-7.

55

[0216] En una forma de realización particular, la composición alimenticia para animales de la invención contiene al menos una proteína. La proteína puede ser una proteína animal, tal como harina de carne y hueso y/o harina de pescado; o puede ser una proteína vegetal. El término proteínas vegetales como se utilizan en este caso se refiere a cualquier compuesto, composición, preparación o mezcla que incluya al menos una proteína derivada u originada de un vegetal, incluyendo proteínas modificadas y derivados de proteína. En formas de realización particulares, el contenido de proteína de las proteínas vegetales es de al menos 10, 20, 30, 40, 50, o 60% (p/p).

60

[0217] Las proteínas vegetales se pueden derivar de fuentes de proteína vegetal, tales como leguminosas y cereales, por ejemplo materiales de plantas de las familias *Fabaceae* (*Leguminosae*), *Cruciferaeae*, *Chenopodiaceae* y *Poaceae*, tales como harina de soja, harina de lupino y harina de semilla de colza.

65

[0218] En una forma de realización particular, la fuente de proteína vegetal es material de una o más plantas de la familia *Fabaceae*, por ejemplo semilla de soja, altramuç, guisante o judía.

[0219] En otra forma de realización particular, la fuente de proteína vegetal es material de una o más plantas de la familia *Chenopodiaceae*, por ejemplo remolacha, remolacha azucarera, espinaca o quinua.

[0220] Otros ejemplos de fuentes de proteínas vegetales son semilla de colza, semilla de girasol, semilla de algodón y repollo.

5 [0221] La semilla de soja es una fuente de proteínas vegetales preferida.

[0222] Otros ejemplos de fuentes de proteínas vegetales son cereales tales como cebada, trigo, centeno, avena, maíz (mazorca), arroz, triticale y sorgo.

10 [0223] En otras formas de realización particulares, la composición de alimento para animales de la invención contiene 0-80% de maíz; y/o 0-80% de sorgo; y/o 0-70% de trigo; y/o 0-70% de cebada; y/o 0-30% de avena; y/o 0-40% de harina de soja; y/o 0-25% de harina de pescado; y/o 0-25% de harina de carne y hueso; y/o 0-20% de lactosuero.

15 [0224] Las dietas para animales se pueden, por ejemplo, fabricar como alimento triturado (no granulado) o alimentación granulado. Típicamente, los materiales alimenticios molidos se mezclan y se les agregan cantidades suficientes de vitaminas esenciales y minerales según las especificaciones para las especies en cuestión. Se pueden agregar polipéptidos como formulaciones polipeptídicas sólidas o líquidas. Por ejemplo, una formulación de polipéptidos sólida se agrega típicamente antes o durante la etapa de mezcla; y una preparación de polipéptido líquida se agrega típicamente después de la etapa de granulación. El polipéptido también se puede incorporar a un aditivo alimenticio o premezcla.

20 [0225] La concentración de polipéptido final en la dieta está en el intervalo de 0,01-200 mg de proteína de polipéptido por kg de dieta, por ejemplo en el rango de 5-30 mg de proteína de polipéptido por kg de dieta animal.

25 [0226] La fitasa de la invención debería por supuesto aplicarse en una cantidad eficaz, es decir, en una cantidad adecuada para mejorar la solubilización y/o mejorar el valor nutricional del alimento. Actualmente se contempla que el polipéptido se administra en una o más de las siguientes cantidades (intervalos de dosificación): 0,01-200, 0,01-100, 0,5-100, 1-50, 5-100, 10-100, 0,05-50 o 0,10-10 - siendo todos estos intervalos en mg de proteína de polipéptido de fitasa por kg de alimento (ppm).

30 [0227] Para determinar los mg de proteína de polipéptido de fitasa por kg de alimento, la fitasa se purifica de la composición alimenticia y la actividad específica de la fitasa purificada se determina usando un ensayo pertinente. La actividad de fitasa de la composición alimenticia como tal también se determina usando el mismo ensayo, y sobre la base de estas dos determinaciones se calcula la dosificación en mg de proteína de fitasa por kg de alimento.

35 [0228] Se pueden aplicar los mismos principios para determinar los mg de proteína de polipéptido de fitasa en aditivos alimenticios. Por supuesto, si se dispone de una muestra de la fitasa usada para preparar el aditivo alimenticio o el alimento, la actividad específica se determina a partir de esta muestra (sin necesidad de purificar la fitasa de la composición o el aditivo alimenticio).

40 Péptido señal

[0229] La presente invención también se refiere a constructos de ácido nucleico que comprenden un gen que codifica una proteína operativamente enlazada a una primera secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 1 a 66 de cualquier SEQ ID n°: 1 o 3, que codifican un péptido señal que consiste en los aminoácidos 1 a 22 de cualquier SEQ ID n°: 2 o 4, donde el gen es foráneo de las primeras secuencias de nucleótidos.

50 [0230] La presente invención también se refiere a vectores de expresión recombinantes y células huésped recombinantes que comprenden tales constructos de ácido nucleico.

[0231] La presente invención también se refiere a métodos para producir una proteína que comprende: (a) cultivo de tal célula huésped recombinante bajo condiciones adecuadas para la producción de la proteína; y (b) recuperación de la proteína.

55 [0232] Las primeras secuencias de nucleótidos pueden estar operativamente enlazadas a genes foráneos individualmente con otras secuencias de control o en combinación con otras secuencias de control. Estas otras secuencias de control están descritas *supra*.

60 [0233] La proteína puede ser nativa o heteróloga de una célula huésped. El término "proteína" no se refiere en este caso a una longitud específica del producto codificado y, por lo tanto, abarca péptidos, oligopéptidos y proteínas. El término "proteína" también abarca dos o más polipéptidos combinados para formar el producto codificado. Las proteínas también incluyen polipéptidos híbridos que comprenden una combinación de secuencias de polipéptidos completas o parciales obtenidas de al menos dos proteínas diferentes, donde una o más pueden ser heterólogas o nativas de la célula huésped. Las proteínas además incluyen variaciones alélicas de origen natural y creadas genéticamente de las proteínas anteriormente mencionadas y proteínas híbridas.

65

[0234] Preferiblemente, la proteína es una hormona o variante de la misma, polipéptido, receptor o parte del mismo, anticuerpo o parte del mismo o indicador. En un aspecto más preferido, la proteína es una oxidorreductasa, transferasa, hidrolasa, liasa, isomerasa o ligasa. En un aspecto incluso más preferido, la proteína es una aminopeptidasa, amilasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celulasa, quitinasa, cutinasa, glicosiltransferasa de ciclodextrina, desoxirribonucleasa, esterasa, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, glucoamilasa, alfa-glucosidasa, beta-glucosidasa, invertasa, lacasa, lipasa, manosidasa, mutanasa, oxidasa, polipéptido pectinolítico, peroxidasa, fitasa, polifenoloxidasas, polipéptido proteolítico, ribonucleasa, transglutaminasa o xilanasas.

[0235] El gen se puede obtener de cualquier procariota, eucariota u otra fuente.

[0236] La presente invención se describe más detalladamente mediante los siguientes ejemplos que no se deben interpretar como limitación del ámbito de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Clonación de una fitasa de *Citrobacter braakii*

[0237] Se hizo un alineamiento múltiple de las siguientes fosfatasa ácida de histidina: appA *Escherichia coli* (SPTREMBL:Q8GN88), phyk *Klebsiella terrigena* (SPTREMBL:Q7WSY1) y ypo1648 *Yersinia pestis* CO92 (SPTREMBL:Q8ZFP6). Se diseñaron dos cebadores oligonucleótidos degenerados basándose en secuencias de consenso:

5'- TGG TGA TTG TGT CCC GTC AYG GNG TNM G -3' (SEQ ID n°: 6, cebador directo)
5'- GCC CGG CGG GGT RTT RTC NGG -3' (SEQ ID n°: 7, cebador inverso).

[0238] Los cebadores se usaron para selección de PCR de varias especies bacterianas a temperaturas de recocimiento de 45, 48 y 50°C.

[0239] Un gen de fitasa parcial en forma de un fragmento de ADN de 900 pares de bases se identificó en *Citrobacter braakii* ATCC 51113.

[0240] El fragmento de PCR se clonó en el pEZSeq pEZSeq Blunt Cloning Kit (catálogo n°: 40501-1 de Lucigen Corporation, 2120 West Greenview Dr., Ste 9, Middleton, WI 53562, US. Primero, el fragmento de PCR se trató con PCRTerminator End Repair Kit (parte del pEZSeq Blunt Cloning Kit), que contiene una mezcla de actividades enzimáticas que se han optimizado para crear extremidades romas 5'-fosforiladas en cualquier tipo de producto PCR. Después de la clonación en el vector pEZSeq, el clon fue secuenciado usando dos cebadores específicos de vector. Mediante la traducción de la secuencia de nucleótidos, se confirmó que el fragmento de ADN clonado era parte del gen de fitasa.

[0241] Para obtener la secuencia de nucleótidos de longitud total del gen se usó el DNA Walking SpeedUp Kit (DWSK-V102 de Seegene, Inc., 2nd Fl., Myungji Bldg., 142-21, Samsung-dong, Kangnam-gu, Seoul, 135-090, Korea), que está diseñado para capturar sitios objetivo desconocidos. Con ese fin, se diseñaron 4 oligonucleótidos específicos y se usaron con el equipo.

TSP1 N: 5'- ACATTTTGGTGCTAACCCAGCC-3' (SEQ ID n°: 8)
TSP1 C: 5'- AGAAGTTGCCCGTAGTAGGGCC-3' (SEQ ID n°: 9)
TSP2N: 5'-ATTCAGAAACAAGTTCTCCCCACG-3' (SEQ ID n°: 10)
TSP2C: 5'- ACCAATCTTGCAAATTAAGCGGGG-3' (SEQ ID n°: 11)

[0242] La secuencia correcta de nucleótidos de longitud completa que codifica la fitasa de *Citrobacter braakii* ATCC 51113 se muestra en el listado de secuencias como SEQ ID n°: 3, y la secuencia de aminoácidos codificados correspondiente tiene SEQ ID n°: 4. Los primeros 22 aminoácidos de SEQ ID n°: 4 se espera que sean un péptido señal (predicho por la señal P V3.0).

[0243] El gen de fitasa de *Citrobacter braakii* ATCC 51113 fue clonado en el vector de expresión de E.coli pET-30a(+) sin indentificativos de fusión (catálogo n°: 69909 de Novagen, disponible comercialmente de Bie & Berntsen A/S, 7 Sandbaekvej, DK-2610 Roedovre, Dinamarca). En este sistema, la expresión del gen se induce mediante una fuente de polimerasa T7 RNA en la cepa huésped de *E. coli* BL21 Star (DE)pLisS (catálogo n°: 69388 de Novagen, disponible comercialmente de Bie & Berntsen) que contiene una copia cromosómica del gen de polimerasa T7 ARN bajo el control del promotor lacUV5. La inducción del gen objetivo se realizó añadiendo lactosa al medio. La lactosa enlazará con el represor e inducirá su disociación del operador, permitiendo la transcripción del promotor.

[0244] Para la expresión del gen de fitasa, se transfirió una única colonia de la cepa de *E. coli* transformada a un cultivo inóculo en los medios no inductores (que contienen glucosa como única fuente de carbono) que no permiten la expresión de la polimerasa T7 RNA. Como control negativo se usó E.coli (BL21 star(DE)pLisS) con un vector vacío pET-

30(+). Se transfirió una pequeña alícuota (de aproximadamente 150 micro litros) del cultivo inóculo en las matraces que contenían lactosa como única fuente de carbono. El cultivo de inducción se cultivó durante toda la noche con agitación a 300 r.p.m. a 37°C.

5 [0245] Las células se cosecharon por centrifugado y se analizaron 15 micro litros de partes alícuotas del sobrenadante por SDS-PAGE. Como marcador de peso molecular (PM) se usaron 10 micro litros de la proteína estándar Precision Plus (catálogo n°: 161-0363, disponible comercialmente de Bio-Rad Laboratories Headquarters, 1000 Alfred Nobel Drive, Hercules, CA 94547, US). Una banda diferente de PM de aproximadamente 50 kDa se identificó en el sobrenadante a partir de la cepa recombinante de *E. coli*, pero no en el control negativo.

10 [0246] El granulado celular cosechado fue lisado y la fracción soluble intracelular se analizó también por SDS-PAGE como se ha descrito anteriormente. También aquí apareció una banda de PM 50 kDa.

15 [0247] Esto es una evidencia de que la proteína de fitasa recombinante se segrega parcialmente a los medios. No obstante, una agrupación de la enzima permanece aún en la fracción intracelular.

[0248] La actividad de fitasa del sobrenadante y la fracción intracelular se confirmaron usando el ensayo del Ejemplo 4.

Ejemplo 2: Preparación de una fitasa de *Citrobacter braakii*

20 [0249] Se cultivó *Citrobacter braakii* ATCC 51113 durante toda la noche con agitación (225 r.p.m.) a 30°C en el medio LB (25 g de caldo LB, Merck 0285, agua intercambiada de iones hasta 1000 ml) con adición de 0,1 % (p/p) de fitato de sodio. Las células fueron cosechadas por centrifugado (4000 r.p.m., 60 min) y el sobrenadante se descartó. El granulado celular fue resuspendido en dos volúmenes de agua destilada con 100 mg/ml de lisozima y fue lisado por incubación durante toda la noche a 37°C. Las células lisadas fueron centrifugadas (4000 r.p.m., 2 h) y el sobrenadante se guardó y se usó para análisis de estabilidad ácida.

Ejemplo 3: Estabilidad ácida de la fitasa de *Citrobacter braakii*

30 [0250] Se mezclaron 50 micro litros del lisado obtenidos en el Ejemplo 2 con 50 micro litros de tampones de 100mM con valores de pH de 2,2, 3,0 (glicina/ácido clorhídrico) y 7,0 (HEPES) respectivamente. Las muestras fueron incubadas durante la noche a 37°C y analizadas para actividad de fitasa residual usando el procedimiento analítico descrito en el Ejemplo 4. La actividad de fitasa residual, expresada como la densidad óptica, se muestra en la Tabla 1 más adelante. Además, la actividad se calcula en porcentajes con respecto a la actividad residual a pH 7.

35

Tabla 1

Actividad Residual [OD] después de incubación a pH:	pH 2,2	pH 2,2 - relativo a pH 7,0	pH 3,0	pH 3,0 - relativo a pH 7,0	pH 7,0	pH 7,0 - relativo a pH 7,0
Cepa:						
<i>Citrobacter braakii</i> ATCC 51113	0,35	95	0,43	116	0,37	100

Ejemplo 4: Ensayo de fitasa

40

[0251] El ensayo se basa en la determinación del fosfato soluble por complexación con molibdato/hierro y la medición fotométrica del color azul en placas de microtitulación.

45 [0252] El sustrato es 0,5mM de Na-fitato (Sigma; P-8810) disuelto en 0,1 M de tampón de acetato, pH=5,5. En una forma de realización particular, la concentración de sustrato es 5mM.

50 [0253] El reactivo de color se prepara de la siguiente manera: se disuelve 1% de amonio molibdato (Merck 1181, (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 4H₂O) en 3,2% de ácido sulfúrico (Merck 731). Se disuelve 1,1 g de ferrosulfato (Merck 3965) en 15 ml del reactivo de molibdato anterior y se añaden 10 ml de 0,5 M de ácido sulfúrico. Se prepara reciente todos los días y se almacena en un lugar oscuro.

[0254] Análisis ciego: se mezclan 20ul de muestra, 100ul de sustrato y 120ul de reactivo de color, se incuban 5 min a 37°C y se mide el OD_{Blind} a 750nm.

55 [0255] Muestra: se mezclan 20ul de muestra, 100ul de sustrato, se incuban 30 min a 37°C, se añade 120ul de reactivo de color, se incuban 5 min a 37°C y la OD_{sample} se mide a 750nm.

$$OD = OD_{\text{sample}} - OD_{\text{Blind}}$$

Ejemplo 5: Preparación de la fitasa recombinante

[0256] La fitasa de SEQ ID n°: 4 fue expresada en *Bacillus subtilis* y purificada usando métodos convencionales: centrifugado, filtración de germen, precipitación de sulfato de amonio (80% de saturación de sulfato de amonio), centrifugado, resuspensión de gránulos en el tampón A (50 mM de acetato sódico, 1,5 M de sulfato de amonio pH 4,5), filtración, cromatografía de interacción hidrofóbica (Phenyl Toyopearl cargado con tampón A, elución con tampón B (50 mM de acetato sódico pH 4,5)), y cromatografía de intercambio de cationes (SP-sefarosa, cargado con 10 mM de citrato de sodio pH 4,0, elución con un gradiente de sal lineal (10 mM de citrato sódico pH 4,0 + 1 M de NaCl).

[0257] Un gel de SDS-PAGE manchado con Coomassie mostró que la fitasa madura purificada era más del 50% pura en una base de proteína. No obstante, se descubrió que la mayor parte de las bandas sin fitasa eran degradaciones de productos o formas truncadas de la fitasa de *C. braakii*. Por consiguiente, la pureza muy superior al 80%, cuando se expresa como la cantidad de productos de fitasa y de degradación de fitasa en relación con la cantidad total de proteínas.

Ejemplo 6: Rendimiento en el alimento para animales

[0258] Se comparó el rendimiento en el alimento para animales de la fitasa de *Citrobacter braakii* purificada del Ejemplo 5, en un modelo *in vitro*, con el rendimiento de una fitasa comercial de *Peniophora lycii* descrito en la WO 98/28408, disponible comercialmente de DSM Nutritional Products, como fitasa RONOZYME P. El modelo *in vitro* simula la digestión de un animal monogástrico y correlaciona bien los resultados obtenidos en los ensayos de animales *in vivo*.

[0259] Se prepararon muestras de alimento compuestas por 30% de harina de soja y 70% de harina de maíz con CaCl₂ agregado a una concentración de 5 g de calcio por kg de alimento y se preincubaron a 40°C y pH 3,0 durante 30 minutos, después se agregó pepsina (3000 U/g de alimento) y dos dosificaciones diferentes de las dos fitasas, es decir, 0,25 o 0,75 unidades de fitasa (FYT)/g de alimento. También se incluyó un espacio en blanco sin actividad de fitasa. Las muestras se incubaron a 40°C y pH 3,0 durante 60 minutos, seguidas de pH 4,0 durante 30 minutos.

[0260] Se pararon las reacciones y se extrajo ácido fítico y fosfatos de inositol por adición de HCl a una concentración final de 0,5 M e incubación a 40°C durante 2 horas, seguido de un ciclo de congelación-descongelación y 1 hora de incubación a 40°C.

[0261] El ácido fítico y los fosfatos de inositol se separaron por cromatografía iónica de alto rendimiento como se describe por "Chen, Q. C. y Li, B.W. (2003). Separation of phytic acid and other related inositol phosphates by high-performance ion chromatography and its applications. Journal of Chromatography A 1018, 41-52" y se cuantificó según "Skoglund, E., Carlsson, N.G., and Sandberg, A.S. (1997). Determination of isomers of inositol mono- to hexaphosphates in selected foods and intestinal contents using high-performance ion chromatography. J. Agric. Food Chem. 45, 431-436".

[0262] El fósforo liberado se calculó como la diferencia en el fósforo unido a inositol-fosfato (IP-P) entre las muestras tratadas y no tratadas con fitasa.

[0263] De los resultados mostrados en la Tabla 2 que aparece más abajo se aprecia claramente que la fitasa de *C. braakii* de la invención es mucho más efectiva que la fitasa comercial en liberación de fosfato a partir del alimento.

Tabla 2

Tratamiento	Dosificación (FYT/g)	Liberación de P relativa (%)
Fitasa de <i>P. lycii</i>	0,25	100
Fitasa de <i>P. lycii</i>	0,75	190
Fitasa de <i>C. braaki</i>	0,25	184
Fitasa de <i>C. braaki</i>	0,75	367

Ejemplo 7: Especificidad de sustrato

[0264] La actividad con pH 5,0 y a 37°C de la fitasa purificada de *Citrobacter braakii* del Ejemplo 5 se evaluó en dos sustratos, es decir, fitato y p-nitrofenil fosfato (pNP-fosfato). Más en particular, la actividad en pNP-fosfato relativa a la actividad en el fitato se determinó comparando lecturas de ensayo de cada sustrato con curvas estándar de fosfato (tampón ciego sustraído).

Materiales

[0265]

- 5 Tampón de dilución enzimática: 0,25 M de tampón de Na-acetato, pH 5,0 incl. 0,005% de Tween-20
 Sustrato de fitasa: fitato de sodio de arroz (Aldrich 274321) 10 mg/ml en 0,25 M de tampón de Na-acetato pH 5,0
 Sustrato pNP-fosfato: dos tabletas de fosfato de p-nitrofenilo de 5 mg (Sigma N9389) disueltas en 10 ml 0,1 M de tampón de Na-acetato pH 5
 10 Solución de molibdato (10% de hepta-molibdato de amonio en 0,25% de solución de amoníaco):
 10 g de hepta-molibdato de amonio (Merck 1.001182) disuelto en 90 ml de H₂O desionizada
 1 ml 25% de solución de amoníaco (Merck 1.05432)
 Vol. ajustado a 100 ml con H₂O desionizada
 15 Reactivo de amonio mono-vanadato (0,24% (p/v) de solución de NH₄VO₃ en 3,25% de HNO₃, Bie & Berntsen, Dinamarca, LAB17650).
 Reactivo de parada (reactivo de molibdato/vanadato en HNO₃): 10 ml de solución de molibdato + 10 ml de reactivo de amonio mono-vanadato + 20 ml de 21,7% de ácido nítrico

20 Procedimiento

- [0266] Se dispensó 75 µl/pocillo de solución enzimática (o tampón ciego) en una placa de microtitulación (Nunc 269620). Se añadió 75 µl de sustrato (fitato de sodio o pNP-fosfato) y la placa se selló con una pieza selladora de placa adhesiva. La placa se colocó rápidamente en un termomezclador Eppendorf equipado con un soporte de placa de microtitulación y se agitó con 750 r.p.m. a 37°C durante 15 min. Se añadió 75 µl de reactivo de parada. Se midió la absorbancia a 405 nm en un espectrofotómetro de placa de microtitulación (Molecular Devices Spectramax 384 Plus). Como bien sabe el experto en la técnica, se evaluaron varias diluciones de la enzima para obtener lecturas de absorbancia adecuadas a 405 nm.

30 Resultados

- [0267] La hidrólisis de fosfato del pNP-fosfato resultó ser 4% de la del fitato. La Tabla 6 de la KR-2004-A- 045267 (WO-2004/085638) muestra que la actividad de la fitasa YH-15 en pNP-fosfato es 11,27% con respecto a la actividad en el fitato, lo que significa que la fitasa de *Citrobacter braakii* de la presente invención es diferente en este respecto.

Ejemplo 8: Estabilidad al ácido

- [0268] La estabilidad al ácido de la fitasa *Citrobacter braakii* purificada del Ejemplo 5 se determinó como actividad de hidrólisis de fosfato residual después de incubación a 37°C y pH 2,0, 2,5 o 3,0 (0,1 M de tampón de glicina/HCl). La actividad residual en el Na-fitato se evaluó a pH 5,5, 37°C, tampón ciego sustraído, y los resultados se compararon con la actividad en tiempo, t = 0.

Materiales

[0269]

- 50 Tampón de dilución enzimática: 0,25 M de tampón de Na-acetato pH 5,5 incl. 0,005% de Tween-20
 Sustrato de fitasa: 1% (p/v) de Na-fitato (Aldrich 274321) disuelto en 0,25 M de Na-acetato pH 5,5
 Reactivo de parada:
 10 ml 10% (p/v) de solución de (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O
 10 ml 0,24% (p/v) de solución de NH₄VO₃
 20 ml 21,7% de solución de HNO₃
 55 10% (p/v) de solución de (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O:
 10 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O (Merck 1.001182) disuelto en 90 ml de agua desionizada
 1 ml 25% (p/v) de solución de NH₃ (Merck 1.05432)
 60 Volumen ajustado a 100 ml usando agua desionizada
 0,24% (p/v) de solución de NH₄VO₃ en 3,25% HNO₃ (Bie & Berntsen, Dinamarca, LAB17650).

- [0270] Se diluyó una solución madre purificada de fitasa de *Citrobacter braakii* almacenada en 20 mM de NaAc pH 4,0 usando 0,1 M de tampón de glicina/HCl (dilución suficiente para asegurar que se obtiene el valor de pH deseado) y se

ES 2 400 828 T3

incubó en un termomezclador Eppendorf a 37°C, 750 r.p.m. (1,5 ml de Eppendorf Protein LoBind Tube, PCR limpio, cat. n°: 2243108-1).

Se evaluó la actividad residual utilizando el procedimiento descrito más abajo.

5 [0271] La actividad de fitasa por ml de la solución madre de fitasa debería permitir: 1) dilución usando el 0,1 M de solución tampón de glicina/HCl para obtener el deseado pH, seguido de 2) dilución usando el tampón de dilución de enzima (véase más arriba) para obtener el pH de las condiciones de ensayo, así dando como resultado una lectura de absorbancia adecuada a 405 nm.

10 Procedimiento de ensayo

[0272] Después de un tiempo, $t = x$ horas, se retiró una muestra de cada mezcla de incubación de pH y se diluyó usando un tampón de dilución de enzima (dilución suficiente para garantizar que se obtiene un pH de 5,5). Se añadió 75 µl de solución enzimática (o tampón ciego, que consiste en un tampón de dilución enzimática) en los pocillos de una placa de microtitulación (Nunc 269620). Se añadió 75 µl de solución de sustrato, la placa se selló con un sellador de placa adhesiva y se transfirió rápidamente a un termomezclador Eppendorf equipado con un soporte de placa de microtitulación. La placa se incubó a 37°C con agitación (750 r.p.m.) durante 15 min. Se añadió 75 µl de reactivo de parada y se leyó la absorbancia a 405 nm en un espectrofotómetro de placa de microtitulación (Molecular Devices Spectramax 190).

20 Resultados

[0273] Se observó una actividad residual significativa tras la incubación a pH 2,0, 37°C durante 4 horas. Asimismo, se observó una actividad residual significativa después 1 día de incubación a pH 2,5, 37°C.

25 [0274] El Ejemplo 4-2 del documento KR-2004-A-045267 (véase el final de la p. 27 de la WO-2004/085638) explica que la actividad enzimática de la fitasa YH-15 casi se perdió tras la incubación bajo pH 3,0 durante 4 horas. La solicitud coreana no habla del tampón usado, pero de la publicación relacionada de Kim *et al.* (Biotechnology Letters 25: 1231-1234, 2003), se ve en la Fig. 2 que se usó un tampón de glicina/HCl, y este tampón se usó también, por lo tanto, en el presente ejemplo.

30 [0275] En conclusión, la fitasa de *Citrobacter braakii* de la presente invención es mucho más estable al ácido en comparación con la fitasa YH-15.

35 Listado de secuencias

[0276]

<110> Novozymes A/S

40 <120> Polipéptidos con actividad de fitasa y polinucleótidos que codifican la misma

<130> 10712.204-WO

45 <160> 11

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

50 <211> 1302

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

55 <223> Variante de SEQ ID n°: 4

<220>

<221> CDS

<222> (1).(1299)

60

<220>

<221> mat_péptido

<222> (67).(1299)

65 <400> 1

atg agt aca ttc atc att cgt tta tta ttt ttt tct ctc tta tgc ggt Met Ser Thr Phe Ile Ile Arg Leu Leu Phe Phe Ser Leu Leu Cys Gly -20 -15 -10	48
tct ttc tca ata cat gct gaa gag cag aat ggt atg aaa ctt gag cgg Ser Phe Ser Ile His Ala Glu Glu Gln Asn Gly Met Lys Leu Glu Arg -5 -1 1 5 10	96
ggt gtg ata gtg agt cgt cat ggr gta aga gca cct acg aag ttc act Val Val Ile Val Ser Arg His Xaa Val Arg Ala Pro Thr Lys Phe Thr 15 20 25	144
cca ata atg aaa aat gtc aca ccc gat caa tgg cca caa tgg gat gtg Pro Ile Met Lys Asn Val Thr Pro Asp Gln Trp Pro Gln Trp Asp Val 30 35 40	192
ccg tta gga tgg cta acg cct cgt ggg gga gaa ctt gtt tct gaa tta Pro Leu Gly Trp Leu Thr Pro Arg Gly Gly Glu Leu Val Ser Glu Leu 45 50 55	240
ggt cag tat caa cgt tta tgg ttc acg agc aaa ggt ctg ttg aat aat Gly Gln Tyr Gln Arg Leu Trp Phe Thr Ser Lys Gly Leu Leu Asn Asn 60 65 70	288
caa acg tgc cca tct cca ggg cag gtt gct gtt att gca gac acg gat Gln Thr Cys Pro Ser Pro Gly Gln Val Ala Val Ile Ala Asp Thr Asp 75 80 85 90	336
caa cgc acc cgt aaa acg ggt gag gcg ctt ctg gct ggg tta gca cca Gln Arg Thr Arg Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro 95 100 105	384
aaa tgt caa att caa gtg cat tat cag aag gat gaa gaa aaa aat gat Lys Cys Gln Ile Gln Val His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Lys Asn Asp 110 115 120	432
cct ctt ttt aat ccg gta aaa atg ggg aaa tgt tcg ttt aac aca ttg	480

Pro	Leu	Phe 125	Asn	Pro	Val	Lys	Met 130	Gly	Lys	Cys	Ser	Phe 135	Asn	Thr	Leu		
cag	ggt	aaa	aac	gct	att	ctg	gaa	cgg	gcc	gga	gga	aat	att	gaa	ctg	528	
Gln	Val 140	Lys	Asn	Ala	Ile	Leu 145	Glu	Arg	Ala	Gly 150	Gly	Asn	Ile	Glu	Leu		
tat	acc	caa	cgc	tat	caa	tct	tca	ttt	cgg	acc	ctg	gaa	aat	ggt	tta	576	
Tyr	Thr	Gln	Arg	Tyr	Gln 160	Ser	Ser	Phe	Arg	Thr 165	Leu	Glu	Asn	Val	Leu 170		
aat	ttc	tca	caa	tcg	gag	aca	tgt	aag	act	aca	gaa	aag	tct	acg	aaa	624	
Asn	Phe	Ser	Gln	Ser 175	Glu	Thr	Cys	Lys	Thr 180	Thr	Glu	Lys	Ser	Thr 185	Lys		
tcg	aca	tta	cca	gag	gct	tta	ccg	tct	gaa	ctt	aag	gta	act	cct	gac	672	
Cys	Thr	Leu	Pro 190	Glu	Ala	Leu	Pro	Ser 195	Glu	Leu	Lys	Val	Thr 200	Pro	Asp		
aat	gta	tca	tta	cct	ggt	gcc	tgg	agt	ctt	tct	tcc	acg	ctg	act	gag	720	
Asn	Val	Ser 205	Leu	Pro	Gly	Ala	Trp 210	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr 215	Leu	Thr	Glu		
ata	ttt	ctg	ttg	caa	gag	gcc	cag	gga	atg	cca	cag	gta	gcc	tgg	ggg	768	
Ile	Phe 220	Leu	Leu	Gln	Glu	Ala 225	Gln	Gly	Met	Pro	Gln 230	Val	Ala	Trp	Gly		
cgt	att	acg	gga	gaa	aaa	gaa	tgg	aga	gat	ttg	tta	agt	ctg	cat	aac	816	
Arg	Ile	Thr	Gly	Glu	Lys 240	Glu	Trp	Arg	Asp	Leu 245	Leu	Ser	Leu	His	Asn 250		
gct	cag	ttt	gat	ctt	ttg	caa	aga	act	cca	gaa	ggt	gcc	cgt	agt	agg	864	
Ala	Gln	Phe	Asp	Leu 255	Leu	Gln	Arg	Thr	Pro 260	Glu	Val	Ala	Arg	Ser 265	Arg		
gcc	aca	cca	tta	ctc	gat	atg	ata	gac	act	gca	tta	ttg	aca	aat	ggt	912	
Ala	Thr	Pro 270	Leu	Leu	Asp	Met	Ile	Asp 275	Thr	Ala	Leu	Leu	Thr 280	Asn	Gly		
aca	aca	gaa	aac	agg	tat	ggc	ata	aaa	tta	ccc	gta	tct	ctg	ttg	ttt	960	
Thr	Thr	Glu 285	Asn	Arg	Tyr	Gly	Ile 290	Lys	Leu	Pro	Val	Ser 295	Leu	Leu	Phe		
att	gct	ggt	cat	gat	acc	aat	ctt	gca	aat	tta	agc	ggg	gct	tta	gat	1008	
Ile	Ala	Gly	His	Asp	Thr 300	Asn 305	Leu	Ala	Asn	Leu	Ser 310	Gly	Ala	Leu	Asp		
ctt	aac	tgg	tcg	cta	ccc	ggt	caa	ccs	gat	aay	acc	ccg	ccg	ggc	gac	1056	
Leu	Asn	Trp	Ser	Leu 315	Pro 320	Gly	Gln	Xaa	Asp	Asn 325	Thr	Pro	Pro	Gly	Asp 330		
aag	ctt	gta	ttc	gaa	aag	tgg	aaa	aga	acc	agt	gat	aat	acg	gat	agg	1104	
Lys	Leu	Val	Phe 335	Glu	Lys	Trp	Lys	Arg	Thr 340	Ser	Asp	Asn	Thr	Asp 345	Trp		
ggt	cag	ggt	tca	ttt	ggt	tat	cag	acg	ctg	aga	gat	atg	agg	gat	ata	1152	
Val	Gln	Val	Ser 350	Phe	Val	Tyr	Gln	Thr 355	Leu	Arg	Asp	Met	Arg 360	Asp	Ile		
caa	ccg	ttg	tcg	tta	gaa	aaa	cct	gct	ggc	aaa	ggt	gat	tta	aaa	tta	1200	
Gln	Pro	Leu 365	Ser	Leu	Glu	Lys	Pro 370	Ala	Gly	Lys	Val	Asp 375	Leu	Lys	Leu		
att	gca	tgt	gaa	gag	aaa	aat	agt	cag	gga	atg	tgt	tcg	tta	aaa	agt	1248	
Ile	Ala	Cys	Glu	Glu	Lys 380	Asn 385	Ser	Gln	Gly	Met 390	Cys	Ser	Leu	Lys	Ser		
ttt	tcc	agg	ctc	att	aag	gaa	att	cgc	gtg	cca	gag	tgt	gca	ggt	acc	1296	

Phe Ser Arg Leu Ile Lys Glu Ile Arg Val Pro Glu Cys Ala Val Thr
395 400 405 410

gaa taa
glu

1302

- <210> 2
- <211> 433
- 5 <212> PRT
- <213> Artificial

- <220>
- <221> misc_características
- 10 <222> (18).(18)
- <223> El 'Xaa' de la ubicación 18 representa Gly.

- <220>
- <221> misc_características
- 15 <222> (323).(323)
- <223> El 'Xaa' de la ubicación 323 representa Pro.

- <220>
- <223> constructo sintético
- 20 <400> 2

Met Ser Thr Phe Ile Ile Arg Leu Leu Phe Phe Ser Leu Leu Cys Gly
 -20 -15 -10

Ser Phe Ser Ile His Ala Glu Glu Gln Asn Gly Met Lys Leu Glu Arg
 -5 -1 1 5 10

Val Val Ile Val Ser Arg His Xaa Val Arg Ala Pro Thr Lys Phe Thr
 15 20 25

Pro Ile Met Lys Asn Val Thr Pro Asp Gln Trp Pro Gln Trp Asp Val
 30 35 40

Pro Leu Gly Trp Leu Thr Pro Arg Gly Gly Glu Leu Val Ser Glu Leu
 45 50 55

Gly Gln Tyr Gln Arg Leu Trp Phe Thr Ser Lys Gly Leu Leu Asn Asn
 60 65 70

Gln Thr Cys Pro Ser Pro Gly Gln Val Ala Val Ile Ala Asp Thr Asp
 75 80 85 90

Gln Arg Thr Arg Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro
 95 100 105

Lys Cys Gln Ile Gln Val His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Lys Asn Asp
 110 115 120

Pro Leu Phe Asn Pro Val Lys Met Gly Lys Cys Ser Phe Asn Thr Leu
 125 130 135

Gln Val Lys Asn Ala Ile Leu Glu Arg Ala Gly Gly Asn Ile Glu Leu
 140 145 150
 Tyr Thr Gln Arg Tyr Gln Ser Ser Phe Arg Thr Leu Glu Asn Val Leu
 155 160 165 170
 Asn Phe Ser Gln Ser Glu Thr Cys Lys Thr Thr Glu Lys Ser Thr Lys
 175 180 185
 Cys Thr Leu Pro Glu Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Val Thr Pro Asp
 190 195 200
 Asn Val Ser Leu Pro Gly Ala Trp Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Glu
 205 210 215
 Ile Phe Leu Leu Gln Glu Ala Gln Gly Met Pro Gln Val Ala Trp Gly
 220 225 230
 Arg Ile Thr Gly Glu Lys Glu Trp Arg Asp Leu Leu Ser Leu His Asn
 235 240 245 250
 Ala Gln Phe Asp Leu Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser Arg
 255 260 265
 Ala Thr Pro Leu Leu Asp Met Ile Asp Thr Ala Leu Leu Thr Asn Gly
 270 275 280
 Thr Thr Glu Asn Arg Tyr Gly Ile Lys Leu Pro Val Ser Leu Leu Phe
 285 290 295
 Ile Ala Gly His Asp Thr Asn Leu Ala Asn Leu Ser Gly Ala Leu Asp
 300 305 310
 Leu Asn Trp Ser Leu Pro Gly Gln Xaa Asp Asn Thr Pro Pro Gly Asp
 315 320 325 330
 Lys Leu Val Phe Glu Lys Trp Lys Arg Thr Ser Asp Asn Thr Asp Trp
 335 340 345
 Val Gln Val Ser Phe Val Tyr Gln Thr Leu Arg Asp Met Arg Asp Ile
 350 355 360
 Gln Pro Leu Ser Leu Glu Lys Pro Ala Gly Lys Val Asp Leu Lys Leu
 365 370 375
 Ile Ala Cys Glu Glu Lys Asn Ser Gln Gly Met Cys Ser Leu Lys Ser
 380 385 390
 Phe Ser Arg Leu Ile Lys Glu Ile Arg Val Pro Glu Cys Ala Val Thr
 395 400 405 410

Glu

<210> 3
 <211> 1299
 <212> ADN
 5 <213> *Citrobacter braakii* ATCC 51113
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1).(1299)
 10 <220>
 <221> mat_péptido
 <222> (67).(1299)
 15 <400> 3

atg agt aca ttc atc att cgt tta tta ttt ttt tct ctc tta tgc ggt	48
Met Ser Thr Phe Ile Ile Arg Leu Leu Phe Phe Ser Leu Leu Cys Gly	
-20 -15 -10	
tct ttc tca ata cat gct gaa gag cag aat ggt atg aaa ctt gag cgg	96
Ser Phe Ser Ile His Ala Glu Glu Gln Asn Gly Met Lys Leu Glu Arg	
-5 -1 1 5 10	
gtt gtg ata gtg agt cgt cat gga gta aga gca cct acg aag ttc act	144
Val Val Ile Val Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Phe Thr	
15 20 25	
cca ata atg aaa aat gtc aca ccc gat caa tgg cca caa tgg gat gtg	192
Pro Ile Met Lys Asn Val Thr Pro Asp Gln Trp Pro Gln Trp Asp Val	
30 35 40	
ccg tta gga tgg cta acg cct cgt ggg gga gaa ctt gtt tct gaa tta	240
Pro Leu Gly Trp Leu Thr Pro Arg Gly Gly Glu Leu Val Ser Glu Leu	
45 50 55	
ggt cag tat caa cgt tta tgg ttc acg agc aaa ggt ctg ttg aat aat	288
Gly Gln Tyr Gln Arg Leu Trp Phe Thr Ser Lys Gly Leu Leu Asn Asn	
60 65 70	
caa acg tgc cca tct cca ggg cag gtt gct gtt att gca gac acg gat	336
Gln Thr Cys Pro Ser Pro Gly Gln Val Ala Val Ile Ala Asp Thr Asp	
75 80 85 90	
caa cgc acc cgt aaa acg ggt gag gcg ttt ctg gct ggg tta gca cca	384
Gln Arg Thr Arg Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro	
95 100 105	
aaa tgt caa att caa gtg cat tat cag aag gat gaa gaa aaa aat gat	432
Lys Cys Gln Ile Gln Val His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Lys Asn Asp	
110 115 120	
cct ctt ttt aat ccg gta aaa atg ggg aaa tgt tcg ttt aac aca ttg	480
Pro Leu Phe Asn Pro Val Lys Met Gly Lys Cys Ser Phe Asn Thr Leu	
125 130 135	
cag gtt aaa aac gct att ctg gaa cgg gcc gga gga aat att gaa ctg	528
Gln Val Lys Asn Ala Ile Leu Glu Arg Ala Gly Gly Asn Ile Glu Leu	
140 145 150	
tat acc caa cgc tat caa tct tca ttt cgg acc ctg gaa aat gtt tta	576
Tyr Thr Gln Arg Tyr Gln Ser Ser Phe Arg Thr Leu Glu Asn Val Leu	
155 160 165 170	
aat ttc tca caa tcg gag aca tgt aag act aca gaa aag tct acg aaa	624

Asn	Phe	Ser	Gln	Ser 175	Glu	Thr	Cys	Lys	Thr 180	Thr	Glu	Lys	Ser	Thr 185	Lys		
tgc	aca	tta	cca	gag	gct	tta	ccg	tct	gaa	ctt	aag	gta	act	cct	gac		672
Cys	Thr	Leu	Pro 190	Glu	Ala	Leu	Pro	Ser 195	Glu	Leu	Lys	Val	Thr 200	Pro	Asp		
aat	gta	tca	tta	cct	ggt	gcc	tgg	agt	ctt	tct	tcc	acg	ctg	act	gag		720
Asn	Val	Ser 205	Leu	Pro	Gly	Ala	Trp 210	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr 215	Leu	Thr	Glu		
ata	ttt	ctg	ttg	caa	gag	gcc	cag	gga	atg	cca	cag	gta	gcc	tgg	ggg		768
Ile	Phe 220	Leu	Leu	Gln	Glu	Ala 225	Gln	Gly	Met	Pro	Gln 230	Val	Ala	Trp	Gly		
cgt	att	acg	gga	gaa	aaa	gaa	tgg	aga	gat	ttg	tta	agt	ctg	cat	aac		816
Arg	Ile	Thr	Gly	Glu	Lys 240	Glu	Trp	Arg	Asp	Leu 245	Leu	Ser	Leu	His	Asn 250		
gct	cag	ttt	gat	ctt	ttg	caa	aga	act	cca	gaa	gtt	gcc	cgt	agt	agg		864
Ala	Gln	Phe	Asp	Leu 255	Leu	Gln	Arg	Thr	Pro 260	Glu	Val	Ala	Arg	Ser 265	Arg		
gcc	aca	cca	tta	ctc	gat	atg	ata	gac	act	gca	tta	ttg	aca	aat	ggt		912
Ala	Thr	Pro	Leu 270	Leu	Asp	Met	Ile	Asp 275	Thr	Ala	Leu	Leu	Thr 280	Asn	Gly		
aca	aca	gaa	aac	agg	tat	ggc	ata	aaa	tta	ccc	gta	tct	ctg	ttg	ttt		960
Thr	Thr	Glu 285	Asn	Arg	Tyr	Gly	Ile 290	Lys	Leu	Pro	Val	Ser 295	Leu	Leu	Phe		
att	gct	ggt	cat	gat	acc	aat	ctt	gca	aat	tta	agc	ggg	gct	tta	gat		1008
Ile	Ala 300	Gly	His	Asp	Thr	Asn 305	Leu	Ala	Asn	Leu	Ser 310	Gly	Ala	Leu	Asp		
ctt	aac	tgg	tcg	cta	ccc	ggt	caa	ccc	gat	aat	acc	cct	cct	ggt	ggg		3056
Leu	Asn	Trp	Ser	Leu	Pro 320	Gly	Gln	Pro	Asp	Asn 325	Thr	Pro	Pro	Gly	Gly 330		
gag	ctt	gta	ttc	gaa	aag	tgg	aaa	aga	acc	agt	gat	aat	acg	gat	tgg		1104
Glu	Leu	Val	Phe	Glu 335	Lys	Trp	Lys	Arg	Thr 340	Ser	Asp	Asn	Thr	Asp 345	Trp		
gtt	cag	ggt	tca	ttt	ggt	tat	cag	acg	ctg	aga	gat	atg	agg	gat	ata		1152
Val	Gln	Val	Ser 350	Phe	Val	Tyr	Gln	Thr 355	Leu	Arg	Asp	Met	Arg 360	Asp	Ile		
caa	ccg	ttg	tcg	tta	gaa	aaa	cct	gct	ggc	aaa	gtt	gat	tta	aaa	tta		1200
Gln	Pro	Leu 365	Ser	Leu	Glu	Lys	Pro 370	Ala	Gly	Lys	Val	Asp 375	Leu	Lys	Leu		
att	gca	tgt	gaa	gag	aaa	aat	agt	cag	gga	atg	tgt	tcg	tta	aaa	agt		1248
Ile	Ala 380	Cys	Glu	Glu	Lys	Asn 385	Ser	Gln	Gly	Met	Cys 390	Ser	Leu	Lys	Ser		
ttt	tcc	agg	ctc	att	aag	gaa	att	cgc	gtg	cca	gag	tgt	gca	ggt	acg		1296
Phe	Ser	Arg	Leu	Ile	Lys 400	Glu	Ile	Arg	Val	Pro 405	Glu	Cys	Ala	Val	Thr 410		
gaa																	1299
Glu																	

<210> 4

<211> 433

<212> PRT

<213> *Citrobacter braakii*, ATCC 51113

5

<400> 4

Met Ser Thr Phe Ile Ile Arg Leu Leu Phe Phe Ser Leu Leu Cys Gly
 -20 -15 -20

Ser Phe Ser Ile His Ala Glu Glu Gln Asn Gly Met Lys Leu Glu Arg
 -5 -1 1 5 10

Val Val Ile Val Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Phe Thr
 15 20 25

Pro Ile Met Lys Asn Val Thr Pro Asp Gln Trp Pro Gln Trp Asp Val
 30 35 40

Pro Leu Gly Trp Leu Thr Pro Arg Gly Gly Glu Leu Val Ser Glu Leu
 45 50 55

Gly Gln Tyr Gln Arg Leu Trp Phe Thr Ser Lys Gly Leu Leu Asn Asn
 60 65 70

Gln Thr Cys Pro Ser Pro Gly Gln Val Ala Val Ile Ala Asp Thr Asp
 75 80 85 90

Gln Arg Thr Arg Lys Thr Gly Glu Ala Phe Leu Ala Gly Leu Ala Pro
 95 100 105

Lys Cys Gln Ile Gln Val His Tyr Gln Lys Asp Glu Glu Lys Asn Asp
 110 115 120

Pro Leu Phe Asn Pro Val Lys Met Gly Lys Cys Ser Phe Asn Thr Leu
 125 130 135

Gln Val Lys Asn Ala Ile Leu Glu Arg Ala Gly Gly Asn Ile Glu Leu
 140 145 150

Tyr Thr Gln Arg Tyr Gln Ser Ser Phe Arg Thr Leu Glu Asn Val Leu
 155 160 165 170

Asn Phe Ser Gln Ser Glu Thr Cys Lys Thr Thr Glu Lys Ser Thr Lys
 175 180 185

Cys Thr Leu Pro Glu Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Val Thr Pro Asp
 190 195 200

Asn Val Ser Leu Pro Gly Ala Trp Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Glu
 205 210 215

Ile Phe Leu Leu Gln Glu Ala Gln Gly Met Pro Gln Val Ala Trp Gly
 220 225 230

Arg Ile Thr Gly Glu Lys Glu Trp Arg Asp Leu Leu Ser Leu His Asn

```

235                      240                      245                      250
Ala Gln Phe Asp Leu Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser Arg
                255                  260
Ala Thr Pro Leu Leu Asp Met Ile Asp Thr Ala Leu Leu Thr Asn Gly
                270                  275                  280
Thr Thr Glu Asn Arg Tyr Gly Ile Lys Leu Pro Val Ser Leu Leu Phe
                285                  290                  295
Ile Ala Gly His Asp Thr Asn Leu Ala Asn Leu Ser Gly Ala Leu Asp
                300                  305                  310
Leu Asn Trp Ser Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly
315                  320                  325                  330
Glu Leu Val Phe Glu Lys Trp Lys Arg Thr Ser Asp Asn Thr Asp Trp
                335                  340                  345
Val Gln Val Ser Phe Val Tyr Gln Thr Leu Arg Asp Met Arg Asp Ile
                350                  355                  360
Gln Pro Leu Ser Leu Glu Lys Pro Ala Gly Lys Val Asp Leu Lys Leu
                365                  370                  375
Ile Ala Cys Glu Glu Lys Asn Ser Gln Gly Met Cys Ser Leu Lys Ser
                380                  385                  390
Phe Ser Arg Leu Ile Lys Glu Ile Arg Val Pro Glu Cys Ala Val Thr
395                  400                  405                  410

```

glu

```

<210> 5
<211> 433
5 <212> PRT
    <213> Citrobacter braakii KCCM 10427

```

```

<220>
10 <221> SEÑAL
    <222> (1).(22)

```

```

    <220>
15 <221> mat_péptido
    <222> (23).(411)

```

```

<400> 5
Met Ser Thr Phe Ile Ile Arg Leu Leu Ile Phe Ser Leu Leu Cys Gly
    -20              -15              -10

```

```

Ser Phe Ser Ile His Ala Glu Glu Gln Asn Gly Met Lys Leu Glu Arg

```

	-5		-1	1				5						10	
Val	Val	Ile	Val	Ser ₁₅	Arg	His	Gly	Val ₂₀	Arg	Ala	Pro	Thr	Lys	Phe ₂₅	Thr
Pro	Ile	Met	Lys ₃₀	Asp	Val	Thr	Pro	Asp ₃₅	Gln	Trp	Pro	Gln	Trp ₄₀	Asp	Val
Pro	Leu	Gly ₄₅	Trp	Leu	Thr	Pro	Arg ₅₀	Gly	Gly	Glu	Leu	Val ₅₅	Ser	Glu	Leu
Gly	Gln	Tyr	Gln	Arg	Leu	Trp ₆₅	Phe	Thr	Ser	Lys	Gly ₇₀	Leu	Leu	Asn	Asn
Gln	Thr	Cys	Pro	Ser	Pro ₈₀	Gly	Gln	Val	Ala	Val ₈₅	Ile	Ala	Asp	Thr	Asp ₉₀
Gln	Arg	Thr	Arg	Lys ₉₅	Thr	Gly	Glu	Ala	Phe ₁₀₀	Leu	Ala	Gly	Leu	Ala ₁₀₅	Pro
Lys	Cys	Gln	Ile ₁₁₀	Gln	Val	His	Tyr	Gln ₁₁₅	Lys	Asp	Glu	Glu	Lys ₁₂₀	Asn	Asp
Pro	Leu	Phe ₁₂₅	Asn	Pro	Val	Lys	Met ₁₃₀	Gly	Lys	Cys	Ser	Phe ₁₃₅	Asn	Thr	Leu
Lys	Val ₁₄₀	Lys	Asn	Ala	Ile	Leu ₁₄₅	Glu	Arg	Ala	Gly	Gly ₁₅₀	Asn	Ile	Glu	Leu
Tyr	Thr	Gln	Arg	Tyr	Gln ₁₆₀	Ser	Ser	Phe	Arg	Thr ₁₆₅	Leu	Glu	Asn	Val	Leu ₁₇₀
Asn	Phe	Ser	Gln	Ser ₁₇₅	Glu	Thr	Cys	Lys	Thr ₁₈₀	Thr	Glu	Lys	Ser	Thr ₁₈₅	Lys
Cys	Thr	Leu	Pro ₁₉₀	Glu	Ala	Leu	Pro	Ser ₁₉₅	Glu	Phe	Lys	Val	Thr ₂₀₀	Pro	Asp
Asn	Val	Ser ₂₀₅	Leu	Pro	Gly	Ala	Trp ₂₁₀	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr ₂₁₅	Leu	Thr	Glu
Ile	Phe ₂₂₀	Leu	Leu	Gln	Glu	Ala	Gln	Gly	Met	Pro	Gln ₂₃₀	Val	Ala	Trp	Gly
Arg ₂₃₅	Ile	Thr	Gly	Glu	Lys ₂₄₀	Glu	Trp	Arg	Asp	Leu ₂₄₅	Leu	Ser	Leu	His	Asn ₂₅₀
Ala	Gln	Phe	Asp	Leu ₂₅₅	Leu	Gln	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Ala	Arg	Ser	Arg ₂₆₅
Ala	Thr	Pro	Leu	Leu	Asp	Met	Ile	Asp	Thr	Ala	Leu	Leu	Thr	Asn	Gly

		270					275			280					
Thr	Thr	Glu 285	Asn	Arg	Tyr	Gly	Ile 290	Lys	Leu	Pro	Val	Ser 295	Leu	Leu	Phe
Ile	Ala 300	Gly	His	Asp	Thr	Asn 305	Leu	Ala	Asn	Leu	Ser 310	Gly	Ala	Leu	Asp
Leu 315	Lys	Trp	Ser	Leu	Pro 320	Gly	Gln	Pro	Asp	Asn 325	Thr	Pro	Pro	Gly	Gly 330
Glu	Leu	Val	Phe	Glu 335	Lys	Trp	Lys	Arg	Thr 340	Ser	Asp	Asn	Thr	Asp 345	Trp
Val	Gln	Val	Ser 350	Phe	Val	Tyr	Gln	Thr 355	Leu	Arg	Asp	Met	Arg 360	Asp	Ile
Gln	Pro	Leu 365	Ser	Leu	Glu	Lys	Pro 370	Ala	Gly	Lys	Val	Asp 375	Leu	Lys	Leu
Ile	Ala 380	Cys	Glu	Glu	Lys	Asn 385	Ser	Gln	Gly	Met	Cys 390	Ser	Leu	Lys	Ser
Phe 395	Ser	Arg	Leu	Ile	Lys 400	Glu	Ile	Arg	Val	Pro 405	Glu	Cys	Ala	Val	Thr 410

glu

5 <210> 6
<211> 28
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Cebador

15 <220>
<221> misc_características
<222> (20).(20)
<223> Y es c, o T

20 <220>
<221> misc_características
<222> (23).(23)
<223> n es a, c, g, o t

25 <220>
<221> misc_características
<222> (26).(26)
<223> n es a, c, g, o t

30 <220>
<221> misc_características
<222> (27).(27)
<223> M es A o C

<400> 6
tggtgattgt gtccccgtcay ggngtnmg

28

<210> 7
 <211> 21
 <212> ADN
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador

 10 <220>
 <221> misc_características
 <222> (13).(13)
 <223> R es A o G

 15 <220>
 <221> misc_características
 <222> (16).(16)
 <223> R es A o G

 20 <220>
 <221> misc_características
 <222> (19).(19)
 <223> n es a, c, g o t

 25 <400> 7
 gcccgcggg gtrtrtcng g 21

 <210> 8
 <211> 22
 30 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador
 35
 <400> 8
 acatttggg gctaaccag cc 22

 <210> 9
 40 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 45 <223> Cebador

 <400> 9
 agaagttgcc cgtagtaggg cc 22

 50 <210> 10
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

 55 <220>
 <223> Cebador

 <400> 10
 60 atcagaaac aagttcticc ccacg 25

 <210> 11
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 65
 <220>

<223> Cebador

<400> 11 25

accaatcttg caaatthaag cgggg

25

5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polipéptido aislado que tiene actividad de fitasa y que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 98,8% de identidad con los aminoácidos 1 a 411 de SEQ ID n°: 2, donde la identidad se determina por el programa "Align" usando la matriz de puntuación por defecto BLOSUM50, la penalización para el primer residuo en un espacio es -12 mientras que la penalización para residuos adicionales en un espacio es -2, y donde la fitasa tiene actividad residual después de una incubación a 37°C y en un tampón de 0,1 M de glicina/HCl pH 2,0 durante 4 horas de al menos 20%.
- 10 2. Polipéptido de la reivindicación 1 que comprende los aminoácidos 1 a 411 de SEQ ID n°: 4.
3. Polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1- 2.
- 15 4. Polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene actividad de fitasa, seleccionado del grupo que consiste en:
 - (a) un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 98,8% de identidad con los aminoácidos 1 a 411 de SEQ ID N°: 2; donde la identidad se determina por el programa "Align" usando la matriz de puntuación por defecto BLOSUM50, la penalización para el primer residuo en un espacio es -12 mientras que la penalización para residuos adicionales en un espacio es -2, y
 - 20 (b) un polinucleótido que tiene al menos 98,5% de identidad con los nucleótidos 67 a 1299 de SEQ ID n°: 1, donde la identidad se determina por el programa "Align" usando la matriz de identidad por defecto, la penalización para el primer nucleótido en un espacio es -16, mientras que la penalización para nucleótidos adicionales en un espacio es -4, y
 - 25 donde la fitasa codificada tiene una actividad residual después de incubación a 37°C y en un tampón de 0,1 M de glicina/HCl pH 2,0 durante 4 horas de al menos 20%.
5. Polinucleótido de la reivindicación 4, seleccionado del grupo que consiste en:
 - (a) un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 1 a 411 de SEQ ID n°: 4 y
 - 30 (b) un polinucleótido que comprende los nucleótidos 67 a 1299 de SEQ ID n°: 3.
6. Constructo de ácido nucleico que incluye el polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 4-5 enlazado operativamente a una o a más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un huésped de expresión.
- 35 7. Vector de expresión recombinante que incluye el constructo de ácido nucleico de la reivindicación 6.
8. Célula huésped recombinante que comprende el constructo de ácido nucleico de la reivindicación 6.
- 40 9. Método de producción del polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-2 que comprende: (a) cultivo de una célula huésped recombinante que comprende un constructo de ácido nucleico que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.
- 45 10. Planta transgénica, parte de planta o célula vegetal que se ha transformado con un polinucleótido que codifica el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
- 50 11. Animal transgénico no humano, o productos o elementos del mismo, que es capaz de expresar el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
12. Uso de al menos un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-2 en alimento para animales.
13. Uso de al menos un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-2 en la preparación de una composición para su uso en alimento para animales.
- 55 14. Método para mejorar el valor nutricional de un alimento para animales, donde al menos un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-2 se añade al alimento.
- 60 15. Aditivo para alimento para animales que incluye:
 - (a) al menos un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-2 y
 - (b) al menos una vitamina liposoluble,
 - (c) al menos una vitamina hidrosoluble, y/o
 - (d) al menos un oligoelemento.

16. Aditivo para alimento para animales de la reivindicación 15 que comprende además al menos una amilasa, al menos una fitasa adicional, al menos una xilanas, al menos una galactanasa, al menos una alfa-galactosidasa, al menos una proteasa, al menos una fosfolipasa y/o al menos una beta-glucanasa.
- 5 17. Composición de alimento para animales que tiene un contenido de proteína cruda de 50 a 800 g/kg y que comprende al menos un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-2.