

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 257**

51 Int. Cl.:

C12N 9/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.11.2008 E 08854492 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2013 EP 2215224**

54 Título: **Polipéptidos que tienen actividad de alfa-glucuronidasa y polinucleótidos que codifican los mismos**

30 Prioridad:

27.11.2007 EP 07121642

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

22.01.2014

73 Titular/es:

**NOVOZYMES A/S (100.0%)
Krogshøjvej 36
2880 Bagsvaerd, DK**

72 Inventor/es:

**HANSEN, EVA HOLM;
SKOVLUND, DOMINIQUE AUBERT y
SOERENSEN, HANNE RISBJERG**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 439 257 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 que tienen actividad de alfa-glucuronidasa y polinucleótidos que codifican los mismos

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 [0001] La presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen actividad de alfa-glucuronidasa y polinucleótidos aislados que codifican los polipéptidos. La invención también se refiere a constructos de ácidos nucleicos, vectores, y células huésped que comprenden los polinucleótidos al igual que métodos de producción y utilización de los polipéptidos.

Antecedentes

15 [0002] Los polisacáridos de pared celular vegetal constituyen el 90% de la pared celular vegetal y se pueden dividir en tres grupos: celulosa, hemicelulosa, y pectina. Celulosa representa el constituyente principal de los polisacáridos de la pared celular. Hemicelulosas son el segundo constituyente más abundante de paredes celulares vegetales. El principal polímero de hemicelulosa es xilano. La estructura de los xilanos encontrados en paredes celulares de plantas puede diferir significativamente dependiendo de su origen, pero siempre contienen un esqueleto de d-xilosa beta-1,4-enlazado. El esqueleto de d-xilosa beta-1,4-enlazado se puede sustituir por varios grupos laterales, tal como L-arabinosa, D-galactosa, acetilo, feruloilo, p-cumarilo, y residuos de ácido glucurónico.

20 [0003] La hidrólisis completa de la hemicelulosa requiere la acción de un complejo de enzimas incluyendo acetilxilano esterasas, ácido ferúlico esterasas, xilanasas, arabinofuranosidasas, xilosidasas y alfa-glucuronidasa. Alfa-glucuronidasa es la enzima que es responsable de la hidrólisis del enlace alfa-1,2-glicosídico entre xilosa y ácido D-glucurónico o su 4-O-metil éter.

25 [0004] Es un objeto de la presente invención proporcionar polipéptidos nuevos con actividad de alfa-glucuronidasa adecuados para el uso en procesos industriales, por ejemplo, en procesos que comprenden conversión de biomasa celulósica en productos útiles incluyendo etanol.

30 [0005] Una alfa-glucuronidasa de *Aureobasidium pullulans* siendo 67,3% idéntica ha sido descrita por de Wet et al. (Enzyme Microb. Technol. 38:649-656, 2006)

Resumen de la invención

35 [0006] La presente invención se refiere a alfa-glucuronidasas, y en particular a alfa-glucuronidasas con una secuencia de aminoácidos homóloga a o idéntica a la alfa-glucuronidasa derivada de *Penicillium aurantiogriseum* y descritas en la SEC ID n.º:2.

[0007] En un primer aspecto la presente invención proporciona un polipéptido aislado con actividad de alfa-glucuronidasa, seleccionado del grupo consistiendo en:

40 (a) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos con al menos un 85%, preferiblemente al menos un 90%, y de la forma más preferible al menos un 95% de identidad con el polipéptido maduro de SEC ID n.º:2;

(b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que hibridiza bajo al menos condiciones de astringencia altísimas con (i) la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n.º:1, (ii) Secuencia de ADN genómico que comprende la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n.º:1, o (iii) una cadena complementaria en toda su longitud de (i) o (ii);

50 (c) un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos un 85%, preferiblemente al menos un 90%, y de la forma más preferible al menos un 95% de identidad con la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n.º:1

55 [0008] En un segundo aspecto la presente invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido del primer aspecto.

60 [0009] En un tercer aspecto la presente invención proporciona un constructo de ácidos nucleicos que comprende el polinucleótido del segundo aspecto operativamente enlazado a una o más (varias) secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un huésped de expresión.

65 [0010] En un cuarto aspecto la presente invención proporciona un vector de expresión recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos del tercer aspecto.

[0011] En un quinto aspecto la presente invención proporciona una célula huésped recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos del tercer aspecto.

5 [0012] En un sexto aspecto la presente invención proporciona un método para producir el polipéptido del primer aspecto, que comprende: (a) cultivo una célula, que en su forma tipo salvaje produce el polipéptido, bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.

10 [0013] En un séptimo aspecto la presente invención proporciona un método para producir el polipéptido del primer aspecto, que comprende: (a) cultivo de una célula huésped que comprende un constructo de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.

15 [0014] En un octavo aspecto la presente invención proporciona un método para producir el polipéptido del primer aspecto, que comprende: (a) cultivo una planta transgénica o una célula de planta que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.

[0015] En un noveno aspecto la presente invención proporciona un método de planta transgénica, parte de planta o célula vegetal transformada con un polinucleótido que codifica el polipéptido del primer aspecto.

20 [0016] En un décimo aspecto la presente invención proporciona un método para producir una proteína, que comprende: (a) cultivar la célula huésped recombinante del aspecto quinto bajo condiciones propicias para la producción de la proteína; y (b) recuperación la proteína.

25 [0017] En un undécimo aspecto la presente invención proporciona un método para degradar o convertir un material de biomasa, que comprende tratar el material con el polipéptido del primer aspecto.

30 [0018] En un duodécimo aspecto la presente invención proporciona una composición que comprende el polipéptido del primer aspecto, y una o más enzima(s) seleccionada(s) de acetilxilano esterasa, ácido ferúlico esterasa, xilanasas, arabinofuranosidasa y xilosidasa.

[0019] En un décimo tercer aspecto la presente invención proporciona un uso del polipéptido del primer aspecto o la composición del duodécimo aspecto en un proceso para la hidrólisis de un material de biomasa que comprende poner en contacto dicha biomasa con dicho polipéptido o dicha composición.

35 **Definiciones**

[0020] **Actividad de alfa-glucuronidasa:** el término "actividad de alfa-glucuronidasa" es definido aquí como una actividad EC 3.2.1.139 que cataliza la reacción $\text{alfa-D-glucuronosida} + \text{H}_2\text{O} = \text{un alcohol} + \text{D-glucuronato}$. Para fines de la presente invención, la actividad de alfa-glucuronidasa se determina según el procedimiento descrito por de Vries (J.Bacteriol, 1998, Vol. 180, p. 243-249). Una unidad de actividad de alfa-glucuronidasa iguala la cantidad de enzima capaz de liberar 1 micromol de ácido glucurónico o 4-O-metilglucurónico por min bajo las condiciones de ensayo estándar descritas en la sección titulada "Determinación de la actividad de alfa-glucuronidasa".

45 [0021] Los polipéptidos de la presente invención tienen como mínimo un 20%, preferiblemente al menos un 40%, más preferiblemente al menos un 50%, más preferiblemente al menos un 60%, más preferiblemente al menos un 70%, más preferiblemente al menos un 80%, incluso más preferiblemente al menos un 90%, de la forma más preferible al menos un 95%, e incluso de la forma más preferible al menos un 100% de la actividad de alfa-glucuronidasa del polipéptido maduro de SEC ID n.º:2.

50 [0022] **Polipéptido aislado:** el término "polipéptido aislado" como se usa aquí se refiere a un polipéptido que está aislado de una fuente. En un aspecto preferido, el polipéptido es al menos 1% puro, preferiblemente al menos 5% puro, más preferiblemente al menos 10% puro, más preferiblemente al menos 20% puro, más preferiblemente al menos 40% puro, más preferiblemente al menos 60%, puro incluso más preferiblemente al menos 80% puro, y de la forma más preferible al menos 90% puro, como se determina por SDS-PAGE.

55 [0023] **Polipéptido sustancialmente puro:** el término "polipéptido sustancialmente puro" denota aquí una preparación de polipéptido que contiene como mucho un 10%, preferiblemente como mucho un 8%, más preferiblemente como mucho un 6%, más preferiblemente como mucho un 5%, más preferiblemente como mucho un 4%, más preferiblemente como mucho un 3%, incluso más preferiblemente como mucho un 2%, de la forma más preferible como mucho un 1%, e incluso de la forma más preferible como mucho un 0,5% en peso de otro material de polipéptido con el cual está asociado originalmente o por recombinación. Es, por lo tanto, preferido que el polipéptido sustancialmente 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, e incluso de la forma más preferible 100% en peso puro del material de polipéptido total presente en la preparación. Los polipéptidos de la presente invención están preferiblemente en forma sustancialmente pura, es decir,

que la preparación de polipéptido está esencialmente libre de otro material de polipéptido con el cual está asociado originalmente o por recombinación. Esto puede ser realizado, por ejemplo, por preparación del polipéptido por métodos recombinantes bien conocidos o por métodos de purificación tradicional.

5 [0024] **Polipéptido maduro:** el término "polipéptido maduro" es definido aquí como un polipéptido con actividad de alfa-glucuronidasa que está en su forma final después de traducción y cualquier modificación postraducciona, tal como tratamiento N-terminal, truncamiento C-terminal, glicosilación, fosforilación, etc. En un aspecto preferido, el polipéptido maduro consiste en aminoácidos 1 a 835 de SEC ID n.º:2.

10 [0025] **Secuencia codificante de polipéptido maduro:** el término "secuencia codificante de polipéptido maduro" es definido aquí como una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido maduro con actividad de alfa-glucuronidasa. En un aspecto preferido, la secuencia codificante de polipéptido maduro consiste en nucleótidos 1 a 2508 de SEC ID n.º:1.

15 [0026] **Identidad:** la relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos es descrita por el parámetro "identidad".

[0027] Para fines de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos es determinado utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) como implementado en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends in Genetics 16: 276-277), preferiblemente versión 3.0.0 o posterior. Los parámetros opcionales usados son penalización abierta de espacio de 10, penalización de extensión del espacio de 0,5, y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión de BLOSUM62 de EMBOSS). El resultado de Needle etiquetado como "identidad más larga" (obtenido utilizando la opción -nobrief) se usa como el porcentaje de identidad y es calculada de la siguiente manera:

$$\text{(Residuos Idénticos x 100)/(Longitud de alineamiento – Número total de espacios en Alineamiento)}$$

30 [0028] Para fines de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de desoxirribonucleótidos es determinado utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, *supra*) como implementado en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, *supra*), preferiblemente versión 3.0.0 o posterior. Los parámetros opcionales usados son penalización abierta de espacio de 10, penalización de extensión del espacio de 0,5, y la matriz de sustitución EDNAFULL (versión de NCBI NUC4.4 de EMBOSS). El resultado de Needle etiquetado como "identidad más larga" (obtenido utilizando la opción -nobrief) se usa como el porcentaje de identidad y se calcula de la siguiente manera:

$$\text{(Desoxirribonucleótidos Idénticos x 100)/(Longitud de alineamiento – Número total de espacios en Alineamiento)}$$

40 [0029] **Secuencia homóloga:** el término "secuencia homóloga" es definido aquí como una proteína predicha que da un valor E (o puntuación de expectativa) inferior a 0,001 en una búsqueda tfasti (Pearson, W.R., 1999, in Bioinformatics Methods and Protocols, S. Misener and S. A. Krawetz, ed., pp. 185-219) con el polipéptido maduro de SEC ID n.º:2.

45 [0030] Alternativamente, el término "secuencia homóloga" se define como una secuencia de aminoácidos con un grado de identidad con el polipéptido maduro de SEC ID n.º:2 de preferiblemente al menos un 85%, más preferiblemente al menos un 90%, de la forma más preferible al menos un 95%, e incluso de la forma más preferible al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, o al menos un 99%, que tiene actividad de alfa-glucuronidasa.

50 [0031] **Fragmento de polipéptido:** el término "fragmento de polipéptido" es definido aquí como un polipéptido con uno o más (varios) aminoácidos eliminados del amino y/o carboxilo terminal del polipéptido maduro de SEC ID n.º:2 o una secuencia homóloga de la misma; donde el fragmento tiene actividad de alfa-glucuronidasa. En un aspecto preferido, un fragmento contiene al menos 500 residuos de aminoácidos, más preferiblemente al menos 600 residuos de aminoácidos, y de la forma más preferible al menos 700 residuos de aminoácidos, tal como al menos 800 residuos de aminoácidos del polipéptido maduro de SEC ID n.º:2 o una secuencia homóloga del mismo.

55 [0032] **Subsecuencia:** el término "subsecuencia" es definido aquí como una secuencia de nucleótido con uno o más (varios) nucleótidos eliminados del extremo 5' y/o 3' de la secuencia de codificación de polipéptido maduro de SEC ID n.º 1 o una secuencia homóloga de la misma; donde la subsecuencia codifica un fragmento de polipéptido con actividad de alfa-glucuronidasa.

60 [0033] **Variante alélica:** el término "variante alélica" denota aquí cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge naturalmente a través de mutaciones, y puede resultar en el polimorfismo dentro de poblaciones. Las mutaciones de gen pueden ser silenciosas (sin cambios en el polipéptido codificado) o puede codificar polipéptidos con secuencias de aminoácidos alteradas. Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

65 [0034] **Polinucleótido aislado:** el término "polinucleótido aislado" como usado aquí se refiere a un polinucleótido que

está aislado de una fuente. En un aspecto preferido, el polinucleótido es al menos 1% puro, preferiblemente al menos 5% puro, más preferiblemente al menos 10% puro, más preferiblemente al menos 20% puro, más preferiblemente al menos 40% puro, más preferiblemente al menos 60%, puro incluso más preferiblemente al menos 80% puro, y de la forma más preferible al menos 90% puro, como determinado por electroforesis en agarosa.

[0035] **Polinucleótido sustancialmente puro:** el término "polinucleótido sustancialmente puro" como se usa aquí se refiere a una preparación polinucleótida libre de otros nucleótidos indeseados o extraños y en una forma adecuada para el uso dentro de sistemas de producción de proteína creada genéticamente. Así, un polinucleótido sustancialmente puro contiene como mucho un 10%, preferiblemente como mucho un 8%, más preferiblemente como mucho un 6%, más preferiblemente como mucho un 5%, más preferiblemente como mucho un 4%, más preferiblemente como mucho un 3%, incluso más preferiblemente como mucho un 2%, de la forma más preferible como mucho un 1%, e incluso de la forma más preferible como mucho un 0,5% en peso de otro material polinucleótido con el cual está asociado originalmente o por recombinación. Un polinucleótido sustancialmente puro puede, no obstante, incluir regiones no traducidas 5' y 3' de origen natural, tales como promotores y terminadores. Se prefiere que el polinucleótido sustancialmente 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, de la forma más preferible al menos 99%, e incluso de la forma más preferible al menos 99,5% en peso puro. Los polinucleótidos de la presente invención están preferiblemente en forma sustancialmente pura, es decir, que la preparación polinucleótida está esencialmente libre de otro material polinucleótido con el cual está asociado originalmente o por recombinación. Los polinucleótidos pueden ser de origen genómico, ADNc, ARN, origen semisintético, sintético, o cualquier combinación de los mismos.

[0036] **Secuencia codificante:** cuando se usa aquí el término "secuencia codificante" significa una secuencia de nucleótidos, que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de su producto proteínico. Los límites de la secuencia codificante están generalmente determinados por un marco de lectura abierto, que empieza normalmente con el codón de inicio ATG o codones de inicio alternativos tales como TTG y GTG y termina con un codón de terminación tal como, TAA, TAG, y TGA. La secuencia codificante puede ser una secuencia de ADN, ADNc, sintética, o de nucleótidos recombinantes.

[0037] **ADNc:** el término "ADNc" es definido aquí como una molécula de ADN que se puede preparar por transcripción inversa de una molécula de ARNm madura, empalmada, obtenida de una célula eucariota. ADNc carece de secuencias de intrón que están normalmente presentes en el ADN genómico correspondiente. La transcripción inicial, primaria de ARN es un precursor para ARNm que se procesa a través de una serie de pasos antes que de aparecer como ARNm empalmado maduro. Estos pasos incluyen la eliminación de secuencias de intrón por un proceso llamado empalme. El ADNc derivado de ARNm carece, por lo tanto, de cualquier secuencia de intrón.

[0038] **Constructo de ácidos nucleicos:** el término "constructo de ácidos nucleicos" como se utiliza en este caso se refiere a una molécula de ácido nucleico, bien mono- o bicatenaria, que se aísla de un gen de origen natural o que se modifica para contener segmentos de ácidos nucleicos en cierto modo que de otra manera no existirían en la naturaleza o que son sintéticos. El término constructo de ácidos nucleicos es sinónimo del término "casete de expresión" cuando el constructo de ácidos nucleicos contiene las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia codificante de la presente invención.

[0039] **Secuencias de control:** el término "secuencias de control" es definido aquí para incluir todos componentes necesarios para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa o extraña a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido o extranjero o nativo entre sí. Tales secuencias de control incluyen, pero de forma no limitativa, una secuencia líder, secuencia de poliadenilación, secuencia de propéptido, promotor, secuencia de péptido señal, y terminador de transcripción. A un mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor, y señales de parada traduccional y transcripcional. Las secuencias de control se pueden proporcionar con enlaces con el objetivo de introducir sitios de restricción específicos que faciliten la ligadura de las secuencias de control con la región de codificación de la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido.

[0040] **Operativamente enlazado:** el término "operativamente enlazado" denota aquí una configuración en que una secuencia de control se coloca en una posición apropiada en relación a la secuencia codificante de la secuencia polinucleótida de modo que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia codificante de un polipéptido.

[0041] **Expresión:** el término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción del polipéptido incluyendo, pero no limitado a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional, y secreción.

[0042] **Vector de expresión:** el término "vector de expresión" es definido aquí como una molécula de ADN circular o lineal que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención y está operativamente enlazado a nucleótidos adicionales que proveen su expresión.

[0043] **Célula huésped:** el término "célula huésped", como se utiliza en este caso, incluye cualquier tipo celular que sea susceptible para la transformación, transfección, transducción, y similares con un constructo de ácidos nucleicos o

vector de expresión que comprende un polinucleótido de la presente invención.

[0044] **Modificación:** el término "modificación" significa aquí cualquier modificación química del polipéptido que consiste en el polipéptido maduro de SEC ID n.º:2 o una secuencia homóloga del mismo; así como la manipulación genética del ADN que codifica tal polipéptido. La modificación puede ser una sustitución, una eliminación y/o una inserción de uno o más (diferentes) aminoácidos al igual que reemplazos de una o más (varias) cadenas laterales de aminoácido.

[0045] **Variante Artificial:** cuando se usa aquí, el término "variante artificial" significa un polipéptido con actividad de alfa-glucuronidasa producido por un organismo que expresa una secuencia de polinucleótido modificada de la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n.º 1 o una secuencia homóloga de la misma. La secuencia de nucleótidos modificada se obtiene a través de intervención humana por modificación de la secuencia polinucleótida descrita en la SEC ID n.º 1 o una secuencia homóloga de la misma.

[0046] **Familias de glucósido hidrolasa (GH):** la numeración de Familias de GH aplicada en esta descripción sigue el concepto de Coutinho, P.M. & Henrissat, B. (1999) CAZy - Carbohydrate-Active Enzymes server en URL: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html> o alternativamente Coutinho, P.M. & Henrissat, B. 1999; The modular structure of cellulases and other carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. En "Genetics, Biochemistry and Ecology of Cellulose Degradation", K. Ohmiya, K. Hayashi, K. Sakka, Y. Kobayashi, S. Karita and T. Kimura eds., Uni Publishers Co., Tokyo, pp. 15-23, y en Bourne, Y. & Henrissat, B. 2001; Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules, Current Opinion in Structural Biology 11:593-600. Un polipéptido de la presente invención es preferiblemente de la familia de GH 67.

Descripción detallada de la invención

Polipéptidos con actividad de alfa-glucuronidasa

[0047] En un aspecto preferido, la presente invención se refiere a polipéptidos aislados que incluyen una secuencia de aminoácidos con un grado de identidad con el polipéptido maduro de SEC ID n.º:2 de preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, de la forma más preferible al menos 95%, e incluso de la forma más preferible al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99%, que tienen actividad de alfa-glucuronidasa (de ahora en adelante "polipéptidos homólogos"). En un aspecto preferido, los polipéptidos homólogos tienen una secuencia de aminoácidos que difiere en diez aminoácidos, preferiblemente en cinco aminoácidos, más preferiblemente en cuatro aminoácidos, incluso más preferiblemente en tres aminoácidos, de la forma más preferible en dos aminoácidos, e incluso de la forma más preferible en un aminoácido del polipéptido maduro de SEC ID n.º:2.

[0048] Un polipéptido de la presente invención preferiblemente comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID n.º:2.

En un aspecto preferido, el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID n.º:2.

En otro aspecto preferido, el polipéptido comprende el polipéptido maduro de SEC ID n.º:2.

En otro aspecto preferido, el polipéptido comprende aminoácidos 1 a 835 de SEC ID n.º:2.

En otro aspecto preferido, el polipéptido comprende aminoácidos 1 a 835 de SEC ID n.º:2.

En otro aspecto preferido, el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID n.º:2.

En otro aspecto preferido, el polipéptido consiste en el polipéptido maduro de SEC ID n.º:2.

En otro aspecto preferido, el polipéptido consiste en aminoácidos 1 a 835 de SEC ID n.º:2.

[0049] En el aspecto preferido, la presente invención se refiere a polipéptidos aislados con actividad de alfa-glucuronidasa que se codifican por polinucleótidos que hibridan bajo condiciones de astringencia preferiblemente altísimas con (i) la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n.º:1, (ii) la Secuencia de ADN genómico que comprende la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n.º:1, (iii) una subsecuencia de (i) o (ii), o (iv) una cadena complementaria en toda su longitud de (i); (ii), o (iii) (J. Sambrook, E.F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d edition, Cold Spring Harbor, New York). Una subsecuencia de la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n.º:1 contiene al menos 100 nucleótidos contiguos o preferiblemente al menos 200 nucleótidos contiguos. Por otra parte, la subsecuencia puede codificar un fragmento de polipéptido con actividad de alfa-glucuronidasa. En un aspecto preferido, la cadena complementaria es la cadena complementaria de longitud completa de la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.º:1.

[0050] La secuencia de nucleótidos de SEC ID n.º:1 o una subsecuencia de la misma; así como la secuencia de aminoácidos de SEC ID n.º:2 o un fragmento de la misma; se pueden usar para diseñar sondas de ácido nucleico para identificar y clonar ADN que codifica polipéptidos con actividad de alfa-glucuronidasa de cepas de géneros diferentes o especies según métodos bien conocida en la técnica. En particular, tales sondas se pueden usar para hibridación con el genómico o ADNc del género o especies de interés, siguiendo procedimientos de transferencia de Southern estándar, para identificar y aislar el gen correspondiente en esto. Tales sondas pueden ser considerablemente más cortas que la secuencia entera, pero deberían tener al menos 14, preferiblemente al menos 25, más preferiblemente al menos 35, y de la forma más preferible al menos 70 nucleótidos de longitud. Es, no obstante, preferido que la sonda de ácido nucleico tenga al menos 100 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, la sonda de ácido nucleico puede tener al menos 200 nucleótidos, preferiblemente al menos 300 nucleótidos, más preferiblemente al menos 400 nucleótidos, o de la forma

5 más preferible al menos 500 nucleótidos de longitud. Sondas más largas incluso pueden ser utilizadas, por ejemplo, sondas de ácido nucleico que tienen preferiblemente al menos 600 nucleótidos, más preferiblemente al menos 700 nucleótidos, incluso más preferiblemente al menos 800 nucleótidos, o de la forma más preferible al menos 900 nucleótidos de longitud. Tanto sondas de ADN como ARN pueden ser usadas. Las sondas están típicamente marcadas para la detección del gen correspondiente (por ejemplo, con ³²P, ³H, ³⁵S, biotina, o avidina). Tales sondas se engloban por la presente invención.

10 [0051] Un ADN genómico o genoteca de ADNc obtenido a partir de tales otras cepas puede, por lo tanto, ser seleccionada para ADN que hibridiza con las sondas anteriormente descritas y codifica un polipéptido con actividad de alfa-glucuronidasa.

15 Genómico u otro ADN de tales otras cepas se pueden separar por electroforesis en gel de poli(acrilamida o agarosa, u otras técnicas de separación. ADN de las bibliotecas o el ADN separado puede ser transferido a e inmovilizado en nitrocelulosa u otro material portador adecuado. Para identificar un clon o ADN que es homólogo a SEC ID n.º 1 o una subsecuencia de la misma; el material portador es preferiblemente usado en una transferencia de Southern.

20 [0052] Para fines de la presente invención, la hibridación indica que la secuencia de nucleótidos hibridiza a una sonda de ácido nucleico marcada que corresponde a la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n.º:1; la secuencia de ADN genómico comprendiendo la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n.º:1; su cadena complementaria en toda su longitud; o una subsecuencia de la misma; bajo condiciones de astringencia de muy bajas a altísimas. Moléculas a la que la sonda de ácido nucleico hibridiza bajo estas condiciones se pueden detectar usando, por ejemplo, película de rayos X.

25 [0053] En un aspecto preferido, la sonda de ácido nucleico es la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n.º:1. En otro aspecto preferido, la sonda de ácido nucleico es nucleótidos 1 a 2508 de SEC ID n.º:1. En otro aspecto preferido, la sonda de ácido nucleico es una secuencia polinucleótida que codifica el polipéptido de SEC ID n.º:2, o una subsecuencia de la misma. En otro aspecto preferido, la sonda de ácido nucleico es SEC ID n.º:1.

30 [0054] Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, condiciones de astringencia de muy bajas a altísimas son definidas como prehibridación e hibridación a 42 °C en 5X SSPE, 0,3% SDS, 200 µg/ml ADN de esperma de salmón desnaturalizado y cortado, y bien 25% de formamida para astringencias bajas y muy bajas, 35% de formamida para astringencias medias y medias altas, o 50% de formamida para astringencias altas y altísimas, siguiendo procedimientos de transferencia de Southern estándar siguiente durante 12 a 24 horas óptimamente.

35 [0055] Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, el material portador es finalmente lavado tres veces cada uno durante 15 minutos usando 2X SSC, 0,2% SDS preferiblemente a 45 °C (astringencia muy baja), más preferiblemente a 50 °C (astringencia baja), más preferiblemente a 55 °C (astringencia media), más preferiblemente a 60 °C (astringencia media alta), incluso más preferiblemente a 65 °C (astringencia alta), y de la forma más preferible a 70 °C (astringencia altísima).

40 [0056] Para sondas cortas que tienen aproximadamente de 15 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, condiciones de astringencia son definidas como prehibridación, hibridación, y post-hibridación de lavado desde alrededor de 5 °C a aproximadamente 10 °C por debajo del T_m calculado utilizando el cálculo según Bolton y McCarthy (11962, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 48:1390) en NaCl 0,9 M, Tris-HCl 0,09 M pH 7,6 EDTA 6 mM, 0,5% NP-40 solución de Denhardt, pirofosfato de sodio 1 mM, fosfato monobásico de sodio 1 mM, 0,1 mM ATP, y 0,2 mg de ARN de levadura por ml siguiendo procedimientos de transferencia de Southern estándar durante 12 a 24 horas óptimamente.

45 [0057] Para sondas cortas que tienen aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, el material portador se lava una vez en 6X SSC más 0,1% SDS durante 15 minutos y dos veces cada uno durante 15 minutos usando 6X SSC a 5 °C a 10 °C por debajo del T_m calculado.

50 [0058] En otro aspecto, la presente invención se refiere a polipéptidos aislados con actividad de alfa-glucuronidasa codificados por polinucleótidos que comprenden o consisten en secuencias de nucleótidos que tienen un grado de identidad con la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n.º:1 de preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, de la forma más preferible al menos 95%, e incluso de la forma más preferible 96%, 97%, 98%, o 99%, que codifican un polipéptido activo. Ver sección polinucleótida aquí.

55 [0059] Preferiblemente, los cambios de aminoácidos son de una naturaleza menor, esto es sustituciones de aminoácidos conservadoras o inserciones que significativamente no afectan al pliegue y/o actividad de la proteína; delecciones pequeñas, típicamente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; extensiones amino o carboxilo terminales pequeñas, tales como un residuo de metionina aminoterminal; un péptido de enlazador pequeño sobre a aproximadamente 20-25 residuos; o una extensión pequeña que facilita purificación por carga de red de cambio u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión.

60 [0060] Ejemplos de sustituciones conservadoras están en el grupo de 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). Sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran actividad específica se conocen en la técnica y son descritas, por ejemplo, por H. Neurath y R.L. Hill, 1979, In, The Proteins, Academic Press, New York. Los cambios que ocurren más frecuentemente son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, y Asp/Gly.

[0061] Además de los 20 aminoácidos estándar, aminoácidos no estándar (tales como 4-hidroxiprolina, 6-*N*-metil lisina, ácido 2-aminoisobutírico, isovalina, y alfa-metil serina) se pueden sustituir por residuos de aminoácidos de un polipéptido de tipo salvaje. Un número limitado de aminoácidos no conservadores, aminoácidos que no codificados por el código genético, y aminoácidos no naturales se pueden sustituir por residuos de aminoácidos. "Aminoácidos no naturales" han sido modificados después de la síntesis de proteína, y/o tienen una estructura química en su(s) cadena(s) lateral(es) diferente(s) de los aminoácidos estándar. Aminoácidos no naturales pueden ser químicamente sintetizados, y preferiblemente, están disponibles comercialmente, e incluyen ácido pipecólico, ácido carboxílico de tiazolidina, dehidroprolina, 3- y 4-metilproline, y 3,3-dimetilproline.

[0062] Alternativamente, los cambios aminoácidos son de tal naturaleza que las propiedades físico químicas de los polipéptidos son alteradas. Por ejemplo, cambios de aminoácidos pueden mejorar la termoestabilidad del polipéptido, alterar la especificidad de sustrato, cambiar el pH óptimo, y similares.

[0063] Aminoácidos esenciales en el polipéptido progenitor se pueden identificar según procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de escaneado de alanina (Cunningham and Wells, 1989, Science 244: 1081 to 1085). En esta técnica, mutaciones de alanina únicas se introducen en cada residuo en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se evalúan para actividad biológica (es decir, actividad de alfa-glucuronidasa) para identificar residuos de aminoácidos que son 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 puede también ser determinado por análisis físico de estructura, como determinado por tales técnicas como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción electrónica, o marcaje por fotoafinidad, conjuntamente con mutación de aminoácidos de sitio de contacto putativo.

Ver, 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 aminoácidos esenciales pueden también ser inferidas del análisis de identidades con polipéptidos que se relacionan con un polipéptido según la invención.

[0064] Sustituciones de aminoácidos únicas o múltiples, deleciones, y/o inserciones pueden ser hechas y evaluadas usando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación, y/o redistribución, seguido de un procedimiento de selección pertinente, tal como aquellos descritos por Reidhaar-Olson and Sauer, 1988, Science 241: 53-57; Bowie y 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, despliegue en fagos (p. ej., Lowman et al., 1991, Biochem. 30: 10832-10837; patente estadounidense n.º 5,223,409; WO 92/06204), y mutagénesis dirigida a la región (Derbyshire et al., 1986, Gene 46: 145; Ner et al., 1988, DNA 7: 127).

[0065] Métodos de mutagénesis/redistribución se pueden combinar con alto rendimiento, métodos de selección automatizados para detectar actividad de polipéptidos clonados, mutagenizados expresados por células huésped (Ness et al., 1999, Nature Biotechnology 17: 893-896). Moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos activos se pueden recuperar de las células huésped y secuenciar rápidamente utilizando métodos estándar de la técnica. Estos métodos permiten la determinación rápida de la importancia de residuos de aminoácidos individuales en un polipéptido de interés, y se pueden aplicar a polipéptidos de estructura desconocida.

[0066] El número total de sustituciones de aminoácidos, deleciones y/o inserciones del polipéptido maduro de SEC ID n.º:2, tales como aminoácidos 1 a 835 de SEC ID n.º:2, es 10, preferiblemente 9, más preferiblemente 8, más preferiblemente 7, más preferiblemente como mucho 6, más preferiblemente 5, más preferiblemente 4, incluso más preferiblemente 3, de la forma más preferible 2, e incluso de la forma más preferible 1.

Fuentes de polipéptidos con actividad de alfa-glucuronidasa

[0067] Un polipéptido de la presente invención se puede obtener de microorganismos de cualquier género. Para fines de la presente invención, el término "obtenido de" como se utiliza en este caso en relación a 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 ha sido insertada. En un aspecto preferido, el polipéptido obtenido de una fuente dada es secretado extracelularmente.

[0068] Un polipéptido con actividad de alfa-glucuronidasa de la presente invención es preferiblemente un polipéptido fúngico. En un aspecto preferido, el polipéptido es un polipéptido de *Penicillium*, y preferiblemente un polipéptido de *Penicillium aurantiogriseum*.

[0069] Será entendido que para las especies anteriormente mencionadas la invención abarca los estados imperfectos y perfectos, y otros equivalentes taxonómicos, por ejemplo, anamorfos, independientemente del nombre de las especies por la que ellos son conocidos. Expertos en la técnica fácilmente reconocerán la identidad de equivalentes apropiados.

5 [0070] Cepas de estas especies son fácilmente accesibles al público en un número de colecciones de cultivo, como the American Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS), y Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

10 [0071] Además, tales polipéptidos se pueden identificar y obtener de otras fuentes incluyendo microorganismos aislados de la naturaleza (p. ej., suciedad, abonos, agua, etc.) utilizando las sondas mencionadas arriba. Técnicas para aislar microorganismos de hábitats naturales se conocen en la técnica. El polinucleótido puede luego ser obtenido por selección de forma similar de una librería genómica o genoteca de ADNc de tal microorganismo. Una vez que una secuencia polinucleótida que codifica un polipéptido ha sido detectada con la(s) sonda(s), el polinucleótido se puede
15 aislar o clonar utilizando técnicas que son bien conocidas por los técnicos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, *supra*).

Polinucleótidos

20 [0072] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que comprenden o consisten en secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos con actividad de alfa-glucuronidasa de la presente invención.

[0073] En un aspecto preferido, la secuencia de nucleótidos comprende o consiste en SEC ID n.º:1. En otro aspecto preferido, la secuencia de nucleótidos comprende o consiste en la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n.º:1. En otro aspecto preferido, la secuencia de nucleótidos comprende o consiste en nucleótidos 1 a 2508 de SEC ID n.º:1. La presente invención también abarca secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos que comprenden o consisten en la secuencia de aminoácidos de SEC ID n.º:2 o el polipéptido maduro de la misma, que difieren de SEC ID n.º:1 o la secuencia codificante de polipéptido maduro de la misma en virtud de la degeneración del código genético. La presente invención también se refiere a polinucleótidos mutantes que comprenden o consisten en al menos una mutación en la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n.º:1, en el que la secuencia de nucleótidos mutante codifica el polipéptido maduro de SEC ID n.º:2.

[0074] Las técnicas usadas para aislar o clonar un polinucleótido que codifica un polipéptido se conocen en la técnica e incluyen el aislamiento de ADN genómico, preparación de ADNc, o una combinación de lo mismo. La clonación de los polinucleótidos de la presente invención de tal ADN genómico pueden ser efectuadas, por ejemplo, usando la conocida reacción en cadena de polimerasa (PCR) o selección de anticuerpos de bibliotecas de expresión para detectar fragmentos de ADN clonado con características estructurales compartidas. Véase, por ejemplo, Innis et al., 1990, PCR: A Guide to Methods and Application, Academic Press, New York. Otros procedimientos de amplificación de ácido nucleico tal como reacción en cadena de la ligasa (LCR), transcripción activada ligada (LAT) y amplificación basada en secuencias de nucleótidos (NASBA) puede ser utilizada. Los polinucleótidos se pueden clonar de una cepa de *Penicillium*, preferiblemente *Penicillium aurantiogriseum*, u otro organismo o relacionado y así, por ejemplo, puede ser una variante alélica o de especie de la región que codifica el polipéptido de la secuencia de nucleótidos.

45 [0075] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que comprenden o consisten en secuencias de nucleótidos que tienen un grado de identidad con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.º:1 de al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, de la forma más preferible al menos 95%, e incluso de la forma más preferible al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% de identidad, que codifica un polipéptido activo.

50 [0076] 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 no ocurren de forma natural. Estos polipéptidos pueden diferir en alguna forma creada genéticamente del polipéptido aislado de su fuente nativa, por ejemplo, variantes artificiales que difieren en la actividad específica, termoestabilidad, pH óptimo, o similar. La secuencia variante se puede construir basándose en la secuencia de nucleótidos presentada como la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n.º:1, por ejemplo, una subsecuencia de la mismas, y/o por introducción de sustituciones de nucleótidos que no dan lugar a otra secuencia de aminoácidos del polipéptido codificadas por la secuencia de nucleótidos, pero que corresponden al uso de codón del organismo huésped destinado para la producción de la enzima, o por introducción de sustituciones de nucleótido que puede dar lugar a una secuencia de aminoácidos diferente. Para una descripción general de sustitución de nucleótido, véase, por ejemplo, Ford et al., 1991, Protein Expression and Purification 2: 95-107.

65 [0077] Será aparente a los expertos en la técnica que tales sustituciones pueden ser hechas fuera de las regiones críticas para la función de la molécula y todavía suponer un polipéptido activo. Residuos de aminoácidos esenciales para la actividad del polipéptido codificados por un polinucleótido aislado de la invención, y por lo tanto preferiblemente no sujeto a sustitución, se puede identificar según procedimientos conocidos en la técnica, tal como mutagénesis

dirigida al sitio o mutagénesis de escaneado de alanina (ver, por ejemplo, Cunningham y Wells, 1989, *supra*). En esta técnica, mutaciones se introducen en cada residuo positivamente cargado en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se evalúan para actividad de alfa-glucuronidasa para identificar residuos de aminoácido que son críticos para la actividad de la molécula. Sitios de interacción sustrato-enzima pueden también ser determinados por análisis de la estructura tridimensional como determinado por técnicas tales como análisis de resonancia magnética nuclear, cristalografía o marcaje por fotoafinidad (véase, por ejemplo, de Voset al., 1992, *supra*; Smith et al., 1992, *supra*; Wlodaver et al., 1992, *supra*).

[0078] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican polipéptidos de la presente invención, que hibridan bajo condiciones de astringencia altísimas con (i) la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n.º:1, (ii) la Secuencia de ADN genómico que comprende la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n.º:1, o (iii) una cadena complementaria en toda su longitud de (i) o (ii); o variantes alélicas y subsecuencias de la misma (Sambrook et al., 1989, *supra*), tal y como se define aquí. En un aspecto preferido, la cadena complementaria es la cadena complementaria en toda su longitud de la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n.º:1.

[0079] La presente divulgación también se refiere a polinucleótidos aislados obtenidos por (a) hibridación de una población de ADN bajo condiciones de astringencia muy bajas, bajas medias, medias altas, altas, o altísimas con (i) la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n.º:1, (ii) la Secuencia de ADN genómico que comprende la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n.º:1, o (iii) una cadena complementaria en toda su longitud a (i) o (ii); y (b) aislamiento del polinucleótido de hibridación, que codifica un polipéptido con actividad de alfa-glucuronidasa. En un aspecto preferido, la cadena complementaria es la cadena complementaria en toda su longitud de la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.º:1.

Constructos de ácidos nucleicos

[0080] La presente invención también se refiere a constructos de ácidos nucleicos que incluyen un polinucleótido aislado de la presente invención operativamente enlazado a una o más (varias) secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

[0081] Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de la presente invención se puede manipular en una variedad de formas para proveer 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 se conocen bien en la técnica.

[0082] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácidos nucleicos de la presente invención en una célula huésped fúngica filamentosa son promotores obtenidos de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, alfa-amilasa ácida estable de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger* o de *Aspergillus awamori* (*glaA*), lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, triosa fosfato isomerasa 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 de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa II 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*, al igual que el promotor NA2-tpi (un híbrido de los promotores de los genes para alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* e isomerasa de fosfato de triosa de *Aspergillus oryzae*); y promotores mutantes, truncados, y promotores híbridos de los mismos.

[0083] En un huésped de levadura, promotores útiles son obtenidos de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), galactocinasa de *Saccharomyces cerevisiae* (GAL1), alcohol dehidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH1, ADH2/GAP), triosa fosfato isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae* (TPI), metalotioneína de *Saccharomyces cerevisiae* (CUP1), y 3-fosfoglicerato-quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros promotores útiles para células huésped de levadura están descritos por Romanos et al., 1992, Yeast 8: 423-488.

[0084] 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 está operativamente enlazada al extremo 3' 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.

[0085] Terminadores preferidos para células huésped fúngicas filamentosas son obtenidos de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*, y proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.

[0086] 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 está operativamente enlazada al extremo 5' 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.

[0087] Secuencias líder preferidas para células huésped fúngicas filamentosas son obtenidas de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

[0088] La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia operativamente enlazada al extremo 3' de la secuencia de nucleótidos y, cuando se transcribe, se reconoce por la célula huésped como una señal para añadir residuos de poliadenosina a ARNm transcrito. Cualquier secuencia de poliadenilación que sea funcional en la célula huésped de elección se puede utilizar en la presente invención.

[0089] Secuencias de poliadenilación preferidas para células huésped fúngicas filamentosas son obtenidas de los genes de TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*, y alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*.

[0090] La secuencia de control también puede ser un péptido señal que codifica una secuencia que codifica una secuencia de aminoácidos enlazada al amino terminal de un polipéptido y dirige el polipéptido codificado en la vía secretora de la célula. El extremo 5' final de la secuencia que codifica la secuencia de nucleótidos puede intrínsecamente contener una secuencia que codifica un péptido señal naturalmente enlazada en el marco de lectura de traducción con el segmento de la secuencia codificante que codifica el polipéptido segregado. Alternativamente, el extremo 5' de la secuencia codificante puede contener una secuencia que codifica un péptido señal que es extraña a la secuencia codificante. La secuencia que codifica el péptido señal extraño se puede requerir donde la secuencia codificante no contiene de forma natural una secuencia que codifica un péptido señal. Alternativamente, la secuencia que codifica el péptido señal extraño puede simplemente reemplazar a la secuencia que codifica el péptido señal natural para mejorar la secreción del polipéptido. No obstante, cualquier secuencia que codifica el péptido señal que dirija el polipéptido expresado en la vía secretora de una célula huésped de elección, es decir, segregado en un medio de cultivo, se puede utilizar en la presente invención.

[0091] Secuencias de codificación de péptido señal eficaces para células huésped fúngicas filamentosas son las secuencias de codificación de 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*, endoglucanasa V de *Humicola insolens*, y lipasa de *Humicola lanuginosa*.

[0092] Péptidos señal útiles para células huésped de levadura son obtenidos de los genes para factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* e invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otras secuencias de codificación de péptido señal útiles son descritas por Romanos et al., 1992, *supra*.

[0093] La secuencia de control también puede ser una secuencia que codifica propéptido que codifica una secuencia de aminoácidos situada en el amino terminal de un polipéptido. El polipéptido resultante es conocido como una proenzima o propolipéptido (o un zimógeno en algunos casos). Un propéptido es generalmente inactivo y se puede convertir a un polipéptido activo maduro por escisión autocatalítica o catalítica del propéptido del propolipéptido. La secuencia codificante de propéptido se puede obtener de los genes para proteasa alcalina de *Bacillus subtilis* (*aprE*), proteasa neutra de *Bacillus subtilis* (*nprT*), factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, y lacasa *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836).

[0094] Donde tanto el péptido señal como secuencias de propéptido están presentes en el amino terminal de un polipéptido, la secuencia del propéptido está situada junto al amino terminal de un polipéptido y la secuencia del péptido señal está situada junto al amino terminal de la secuencia de propéptido.

Vectores de expresión

[0095] 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 traduccional y transcripcional. Los varios ácidos nucleicos y secuencias de control descritos aquí se pueden juntar para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más (diferentes) sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o sustitución de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido en tales sitios. Alternativamente, una secuencia polinucleótida de la presente invención se puede expresar por inserción de la secuencia de nucleótidos o un constructo de ácidos nucleicos comprendiendo la secuencia en un vector apropiado para la expresión. En la creación del vector de expresión, la secuencia codificante se localiza en el vector de modo que la secuencia codificante está operativamente enlazada a las secuencias de control apropiadas para la expresión.

[0096] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (p. ej., un plásmido o virus) que pueda ser convenientemente sometido a procedimientos de ADN recombinante y pueda provocar expresión de la secuencia de nucleótidos. La elección del vector típicamente dependerá de la compatibilidad del vector con la célula huésped en que

el vector deba ser introducido. Los vectores pueden ser plásmidos lineales o cerrados circulares.

[0097] El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, la replicación del cual 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 con el(los) cromosoma(s) en que ha sido integrado. Además, un único vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ADN total que debe ser introducido en el genoma de la célula huésped, o un transposón, puede ser utilizado.

[0098] Los vectores de la presente invención preferiblemente contienen uno o más (varios) marcadores seleccionables que permiten una selección fácil de células transformadas, modificadas, transducidas, o similar. Una etiqueta seleccionable es un gen el producto del cual proporciona resistencia biocida o vírica, resistencia para metales pesados, prototrofia para auxótrofos, y similares.

[0099] Marcadores seleccionables para el uso en una célula huésped fúngica filamentosa incluyen, pero de forma no limitativa, *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina-carbamoiltransferasa), *bar* (fosfonitricina acetiltransferasa), *hph* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrato-reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato-descarboxilasa), *sC* (adeniltransferasa de sulfato), y *trpC* (antranilato sintasa), al igual que equivalentes han de lo mismo. Para uso en una célula *Aspergillus* se prefieren los genes *amdS* y *pyrG* de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y el gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*.

[0100] Los vectores de la presente invención preferiblemente contienen un(unos) elemento(s) que permite(n) la integración del vector en el genoma de la célula huésped o la replicación autónoma del vector en la célula independientemente del genoma.

[0101] Para la integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede depender de la secuencia de polinucleótidos que codifica el polipéptido o cualquier otro elemento del vector para integración en el genoma por 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 a una(s) ubicación(es) precisa(s) en el(los) cromosoma(s). Para aumentar la probabilidad de integración en una ubicación precisa, los elementos integracionales deberían preferiblemente contener un número suficiente de ácidos nucleicos, tal como 100 a 10 000 pares de bases, preferiblemente 400 a 10 000 pares de bases, y de la forma más preferible 800 a 10 000 pares de bases, que tengan un grado alto de identidad con la secuencia objetivo correspondiente para mejorar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos integracionales pueden ser cualquier secuencia que sea homóloga a la secuencia objetivo en el genoma de la célula huésped. Además, los elementos integracionales pueden ser secuencias no codificantes o codificantes de nucleótidos. Por otro lado, el vector se puede integrar en el genoma de la célula huésped por recombinación no homóloga.

[0102] Ejemplos de orígenes de replicación útiles en una célula micótica filamentosa son AMA1 y ANS1 (Gems et al., 1991, Gene 98: 61 to 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 comprendan el gen se puede realizar según los métodos descritos en WO 00/24883.

[0103] Más de una copia de un polinucleótido de la presente invención se puede insertar en una célula huésped para aumentar la producción del producto génico. Un aumento en el número de copias del polinucleótido se puede obtener 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 células que contienen copias amplificadas del gen marcador seleccionable, y copias así adicionales del polinucleótido, se pueden seleccionar por cultivo de las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

[0104] Los procedimientos usados para enlazar los elementos anteriormente descritos para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención se conocen por un experto en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, *supra*).

Células huésped

[0105] La presente invención también se refiere a células huésped recombinantes, que incluyen un polinucleótido aislado de la presente invención, que son ventajosamente usadas 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 mantiene como un integrante cromosómico o como un vector extracromosomal que se duplica como se describe anteriormente. El término "célula huésped" abarca cualquier descendiente de una célula madre que no sea idéntico a la célula madre debido a mutaciones que ocurren durante la replicación. La elección de una célula huésped en gran parte dependerá del gen que codifica el polipéptido y su fuente.

[0106] La célula huésped puede ser una eucariota, tal como una mamífera, insecto, planta, o célula fúngica.

[0107] En un aspecto preferido, la célula huésped es una célula fúngica. "Hongo" como se utiliza en este caso incluye el phyla Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, y Zygomycota (como definido por Hawksworth et al., In, Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8th edition, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK) al igual que la Oomycota (como citado en el Hawksworth et al., 1995, *supra*, page 171) y todos los hongos mitospóricos (Hawksworth et al., 1995, *supra*).

[0108] En un aspecto más preferido, la célula huésped fúngica es una célula de levadura. "Levadura" como se utiliza en este caso incluye levadura ascoesporógena (Endomycetales), levadura basidioesporogénea, y levadura de los Fungi Imperfecti (Blastomycetes). Ya que la clasificación de la levadura puede cambiar en el futuro, para los fines de esta invención, la levadura debe ser definida como se describe en la Biology and Activities of Yeast (Skinner, F.A., Passmore, S.M., and Davenport, R.R., eds, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series No. 9, 1980).

[0109] En un aspecto más preferido incluso, la célula huésped de levadura es una célula *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromices*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosacaromices*, o de *Yarrowia*.

[0110] En un aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es un *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*.

[0111] En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica es una célula micótica filamentosa. "Hongos filamentosos" incluyen todas formas filamentosas de la subdivisión Eumycota y Oomycota (como definido por Hawksworth et al., 1995, *supra*). Los hongos filamentosos están generalmente caracterizados por una pared micelial compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano, y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo es por alargamiento 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.

[0112] En un aspecto más preferido incluso, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomices*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trametes*, o de *Trichoderma*.

[0113] En un aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* o de *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 *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis pannocinta*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Chrysosporium keratinofilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium zonatum*, *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*.

[0114] Células fúngicas se pueden transformar por un proceso que implica la formación de protoplasto, transformación de los protoplastos, y regeneración de la pared celular en un modo conocido *per se*. Procedimientos adecuados para transformación de células huésped de *Aspergillus* y *Trichoderma* están descritos en EP 238 023 y Yelton et al., 1984, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81: 1470-1474. Métodos adecuados para la transformación de especies de *Fusarium* son descritas por Malardier et al., 1989, Gene 78: 147-156, y WO 96/00787. La levadura se puede transformar utilizando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, In 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 ; and Hinnen et al., 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 1920.

Métodos de producción

[0115] La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención, que comprende: (a) cultivar una célula, que en su forma tipo salvaje produce el polipéptido, bajo condiciones propicias

para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido. En un aspecto preferido, la célula es del género *Penicillium*.

En un aspecto más preferido, la célula es *Penicillium aurantiogriseum*.

5 [0116] La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención, que comprende: (a) cultivar una célula huésped recombinante, como se describe en este caso, bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.

10 [0117] La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención, que comprende: (a) cultivar una célula huésped recombinante 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 secuencia que codifica el polipéptido maduro de SEC ID n.º:1, donde la secuencia de nucleótidos mutante codifica un polipéptido que comprende o consiste en el polipéptido maduro de SEC ID n.º:2, y (b) recuperación del polipéptido.

15 [0118] En los métodos de producción de la presente invención, las células se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción del polipéptido utilizando 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 a pequeña escala (incluyendo fermentación continua, por lote, lote alimentado, o de estado sólido) en el laboratorio o fermentadores industriales realizados en un medio adecuado y bajo condiciones que permitan que el polipéptido sea expresado y/o aislado. El cultivo tiene lugar en un medio nutritivo adecuado que comprende fuentes de nitrógeno y carbono y sales inorgánicas, utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según composiciones publicadas (p. ej., en catálogos de the 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 se segrega en el medio, este se puede recuperar de lisatos celulares.

25 [0119] Los polipéptidos se pueden detectar utilizando métodos conocidos en la técnica que son específicos para los polipéptidos. Estos métodos de detección pueden incluir el uso de anticuerpos específicos, formación de un producto enzimático, o desaparición de un sustrato enzimático. Por ejemplo, un ensayo enzimático se puede utilizar para determinar la actividad del polipéptido como se describe en este caso.

30 [0120] 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 incluyendo, pero no limitado a, centrifugado, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación, o precipitación.

35 [0121] Los polipéptidos de la presente invención se pueden purificar por una variedad de procedimientos conocida en la técnica incluyendo, pero no limitado a, cromatografía (p. ej., intercambio iónico, afinidad, hidrofóbica, cromatofoco, y exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (p. ej., isoelectroenfoco 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) para obtener polipéptidos sustancialmente puros.

40 **Plantas**

[0122] La presente invención también se refiere a plantas, por ejemplo, una planta transgénica, parte de planta, o célula vegetal, que incluye un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido con actividad de alfa-glucuronidasa de la presente invención para expresar y producir el polipéptido en cantidades recuperables. El polipéptido se puede recuperar de la planta o parte de planta. Alternativamente, la planta o parte de planta con el polipéptido recombinante se puede utilizar como tal para mejorar la calidad de un alimento o alimentación, por ejemplo, mejorar el valor nutricional, palatabilidad, y propiedades reológicas, o para destruir un factor antinutritivo.

50 [0123] La planta transgénica puede ser dicotyledonous (un dicotiledóneo) o monocotyledonous (un monocotiledónea). Ejemplos de plantas monocotiledóneas son hierbas, tal como poa de prados (poa pratense, Poa), hierba forrajera tal como *Festuca*, *Lolium*, césped templado, tal como *Agrostis*, y cereales, por ejemplo, trigo, avena, centeno, cebada, arroz, sorgo, y maíz (maíz).

55 [0124] Ejemplos de plantas dicotiledóneas son tabaco, leguminosas, tales como altramuces, patata, remolacha azucarera, guisante, judía y semilla de soja, y planta crucífera (de la familia *Brassicaceae*), tales como coliflor, semilla de colza, y el organismo modelo cercanamente relacionado *Arabidopsis thaliana*.

60 [0125] Ejemplos de partes de planta son vástago, callo, hojas, raíz, frutas, semillas, y tubérculos al igual que los tejidos individuales que comprenden estas partes, por ejemplo, epidermis, mesofilo, parénquima, tejidos vasculares, meristemas. Compartimentos de célula vegetal específica, tales como cloroplastos, apoplastos, mitocondria, vacuolas, peroxisomas y citoplasma son también considerados que son una parte de planta. Además, cualquier célula vegetal, independientemente del origen del tejido, se considera que es una parte de planta. Asimismo, partes de planta tales como tejidos específicos y células aisladas para facilitar la utilización de la invención se considera también que son partes de planta, por ejemplo, embriones, endospermas, aleurona y revestimientos de semillas.

[0126] También están incluidos dentro del campo de la presente invención la descendencia de tales plantas, partes de planta, y células vegetales.

[0127] 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 breve, la planta o célula vegetal se construye por incorporación de uno o más (varios) constructos de expresión que codifican un polipéptido de la presente invención en el genoma de huésped de planta o genoma de cloroplasto y propagación de la planta modificada resultante o célula vegetal en una planta transgénica o célula vegetal.

[0128] El constructo de expresión es convenientemente un constructo de ácidos nucleicos que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención operativamente enlazado con secuencias reguladoras apropiadas requeridas para la expresión de la secuencia de nucleótidos en la planta o parte de planta de elección. Además, el constructo de expresión puede comprender una etiqueta seleccionable útil para identificar células huésped en que el constructo de expresión ha sido integrado y secuencias de ADN necesarias para la introducción del constructo en la planta en cuestión (este depende del método utilizado para la introducción de ADN).

[0129] La elección de secuencias reguladoras, tales como promotores y secuencias terminadoras y opcionalmente señales o secuencias de tránsito es determinada, por ejemplo, basándose en cuándo, dónde, y cómo se desea que el polipéptido sea expresado. 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 génico puede estar dirigido a un tejido específico o parte de planta tales como semillas u hojas. Secuencias reguladoras están, por ejemplo, descritas por Tague et al., 1988, *Plant Physiology* 86: 506.

[0130] Para expresión constitutiva, el 35S-CaMV, la ubiquitina-1 de maíz, y el promotor de actina-1 de arroz se puede utilizar (Franck et al., 1980, *Cell* 21: 285-294, Christensen et al., 1992, *Plant Mo. Biol.* 18: 675-689 ; Zhang et al., 1991, *Plant Cell* 3: 1155-1165). 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 como la glutelina, prolamina, globulina, o promotor 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 desconocida de *Vicia faba* (Conrad et al., 1998, *Journal of Plant Physiology* 152: 708-711), un promotor de una proteína del cuerpo de aceite de semilla (Chen et al., 1998, *Plant and Cell Physiology* 39: 935- 941), promotor *napA* la proteína de almacenamiento 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 (Kyoizuka et al., 1993, *Plant Physiology* 102: 991 to 1000, el promotor de gen de adenina metiltransferasa de virus de chlorella (Mittra and Higgins, 1994, *Plant Molecular Biology* 26: 85-93), o el promotor de gen *aldP* de arroz (Kagaya et al., 1995, *Molecular and General Genetics* 248: 668-674), o un promotor inducible dañado como el promotor *pin2* de patata (Xu et al., 1993, *Plant Molecular Biology* 22: 573-588). Asimismo, el promotor puede inducible por tratamientos abióticos tal como temperatura, sequía, o alteraciones en la salinidad o inducidas por sustancias exógenamente aplicadas que activan el promotor, por ejemplo, etanol, estrógenos, hormonas de planta tal como etileno, ácido abscísico, y ácido giberélico, y metales pesados.

[0131] Un elemento intensificador del promotor también se puede usar para conseguir mayor expresión de un polipéptido de la presente invención en la planta. Por ejemplo, el elemento intensificador del promotor puede ser un intrón que es colocado entre el promotor y la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención. Por ejemplo, Xu et al., 1993, *supra*, revela el uso del primer intrón del gen de actina-1 de arroz para mejorar la expresión.

[0132] El gen marcador seleccionable y cualquiera de las otras partes del constructo de expresión se pueden elegir de aquellos disponibles en la técnica.

[0133] El constructo de ácidos nucleicos se incorpora en el genoma de planta según técnicas convencionales conocidas en la técnica, incluyendo transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación mediada de virus, microinyección, bombardeo de partícula, transformación biolística, y electroporación (Gasser et al., 1990, *Science* 244: 1293 ; Potrykus, 1990, *Bio/Technology* 8: 535 ; Shimamoto et al., 1989, *Nature* 338: 274).

[0134] Actualmente, la transferencia de gen mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es el método de elección para generar dicotiledóneas transgénicas (para una revisión, véase Hooykas and Schilperoort, 1992, *Plant Molecular Biology* 19: 15-38) y también pueden usarse para transformar monocotiledóneas, aunque otros métodos de transformación son frecuentemente usados para estas plantas. Actualmente, el método de elección para la generación de monocotiledóneas transgénicas es bombardeo de partícula (oro microscópico o partículas de tungsteno recubierto con la transformación ADN) de callos embrionarios o desarrollo de embriones (Christou, 1992, *Plant Journal* 2: 275-281 ; Shimamoto, 1994, *Current Opinion Biotechnology* 5: 158-162 ; Vasil et al., 1992, *Bio/Technology* 10: 667-674). Un método alternativo para la transformación de monocotiledóneas se basa en transformación de protoplasto como se describe por Omirulleh et al., 1993, *Plant Molecular Biology* 21: 415-428.

[0135] Después de la transformación, los transformantes que han incorporado el constructo de expresión se seleccionan y 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 o en las siguientes generaciones usando, por ejemplo, cotransformación con dos constructos de ADN-T separados o escisión específica de sitio del gen de selección por una recombinasa específica.

[0136] La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención que comprende: (a) cultivar una planta transgénica o una célula vegetal que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido con actividad de alfa-glucuronidasa de la presente invención bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.

Composiciones

[0137] La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden un polipéptido de la presente invención.

[0138] La composición puede comprender un polipéptido de la presente invención como el componente enzimático principal, por ejemplo, una composición monocomponente. Alternativamente, la composición puede comprender actividades enzimáticas múltiples, tales como una acetilxilano esterasa, arabinofuranosidasa, aminopeptidasa, amilasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celulasa, quitinasa, cutinasa, ciclodextrina glicosiltransferasa, desoxiribonucleasa, esterasa, esterasa de ácido ferúlico, alfa galactosidasa, beta-galactosidasa, glucoamilasa, alfa-glucosidasa, beta-glucosidasa, haloperoxidasa, invertasa, lacasa, lipasa, manosidasa, oxidasa, enzima pectinolítica, peptidoglutaminasa, peroxidasa, fitasa, polifenoloxidasa, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa, xilanasas o xilosidas.

[0139] La(s) enzima(s) adicional(es) puede(n) ser producida(s), por ejemplo, por un microorganismo del género *Aspergillus*, preferiblemente *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, o *Aspergillus oryzae*; *Fusarium*, preferiblemente *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 sulphureum*, *Fusarium toruloseum*, *Fusarium trichothecioides*, o *Fusarium venenatum*; *Humicola*, preferiblemente *Humicola insolens* o *Humicola lanuginosa*; o *Trichoderma*, preferiblemente *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, o *Trichoderma viride*.

[0140] Las composiciones de polipéptido se pueden preparar conforme a métodos conocidos en la técnica y pueden estar en forma de líquido o una composición seca. Por ejemplo, la composición de polipéptido puede estar en forma de granulado o microgranulado. El polipéptido que será incluido en la composición se puede estabilizar conforme a métodos conocidos en la técnica.

[0141] A continuación se ofrecen algunos ejemplos de usos preferidos de las composiciones de polipéptido de la invención. La dosificación de la composición de polipéptido de la invención y otras condiciones bajo las que la composición se usa se pueden determinar basándose en métodos conocidos en la técnica.

Usos

[0142] La presente invención está también dirigida a métodos para uso de los polipéptidos con actividad de alfa-glucuronidasa, o composiciones de los mismos.

[0143] Un polipéptido con actividad de alfa-glucuronidasa de la presente invención se puede utilizar en diferentes aplicaciones para degradar o convertir un material de biomasa, es decir un material que comprende xilano sustituido por ácido glucurónico por tratamiento del material con una cantidad eficaz del polipéptido.

[0144] Los polipéptidos de la presente invención son preferiblemente usados en conjunción con otras enzimas de degradación de xilano tales como acetilxilano esterases, ácido ferúlico esterases, xilanasas, arabinofuranosidasas, y xilosidasas en procesos donde el xilano tiene que ser degradado.

[0145] Los polipéptidos con actividad de alfa-glucuronidasa son útiles en un número de aplicaciones: modificación de piensos para animales que contienen xilano sustituido por ácido glucurónico para mejorar la digestibilidad; aplicaciones generales que resultan de degradación de biomasa o conversión a azúcares fermentables en la producción de, por ejemplo, combustible y/o etanol potable; tratamiento de auxiliares utilizados en la deslignificación de pulpa y de papel; componente de sistemas de descudado enzimático para tejidos; aplicaciones alimenticias, por ejemplo, cocción, en combinación con otras funciones enzimáticas para mejorar las propiedades físicas de productos horneados; y aplicaciones de detergente para ropa en combinación con otras funciones enzimáticas. Los polipéptidos o composiciones pueden ser utilizados para producir o modificar una fibra nutritiva/dietética y/o para producir una xilosa, arabinosa y/o xilosa lineal o para producir derivados de xilosa, arabinosa por fermentación, tratamiento enzimático o

síntesis química.

[0146] Preferiblemente el material de biomasa, es decir un material que comprende xilano sustituido de ácido glucurónico es seleccionado de la lista que consiste en plantas de cultivo de energía boscosa y/o herbácea, alimento agrícola y plantas de cultivo de alimentación, productos de pienso para animales, tubérculos, raíces, tallos, leguminosas, cáscaras de mandioca, vainas de cacao, cáscaras de arroz y/o cascotes, salvado de arroz, mazorcas, paja, vainas, cáscaras, pulpa de remolacha azucarera, pulpa de semilla de algarroba, bagazo de manzanas vegetales, residuos de planta de cultivo agrícola, paja, tallos, hojas, salvado de maíz, cáscaras, mazorcas, cáscara, cubiertas, vainas, residuos de madera, corteza, virutas, serrín, pulpa de madera, solución de reducción a pasta, papelón, cartón, residuos de madera, residuos industriales o sólidos de aguas de desecho municipales, abono, subproducto de elaboración y/o procesos de fermentación, grano de destiladores mojados, grano de destiladores secos, grano consumido, vinaza y bagazo.

[0147] En una forma de realización el polipéptido con actividad de alfa-glucuronidasa se usa en un proceso que comprende hidrólisis de una biomasa celulósica, dicho proceso que comprende poner en contacto la biomasa con el polipéptido, por ejemplo, en un proceso para producir etanol de biomasa celulósica o para mejorar el valor nutricional del pienso para animales. En una forma de realización preferida el polipéptido con actividad de alfa-glucuronidasa se usa para degradar la parte celulósica de un sustrato que consiste principalmente en almidón, por ejemplo, la suspensión de grano molido en un proceso que comprende producir una hidrólisis de almidón, por ejemplo, tal como en un proceso de fermentación basado en almidón, por ejemplo, un proceso de etanol.

Determinación de la actividad de alfa-glucuronidasa

[0148] Para fines de la presente invención, la actividad de alfa-glucuronidasa se determina según el procedimiento descrito por de Vries (J.Bacteriol, 1998, Vol. 180, p. 243-249). Una unidad de alfa-glucuronidasa es la cantidad de enzima que libera 1 micromol de ácido glucurónico o 4-O-metilglucurónico por min bajo las condiciones de ensayo estándar de a continuación.

[0149] La mezcla de incubación para el ensayo de alfa-glucuronidasa (volumen total, 0,2 ml) contiene 0,16 ml de sustrato (2 mg de ácido aldatriurónico-ácido aldobiurónico [80:20] en tampón de acetato sódico 0,05 M [pH 5,0]) y 0,04 ml de la solución enzimática que debe ser evaluada. La incubación se comienza por adición de la enzima. Después de 30 min de incubación a 40 °C, la reacción se detiene haciendo hervir las muestras durante 4 min. Los precipitados se eliminan por centrifugado (10,000 X g), después de lo cual el sobrenadante se transfiere a un tubo nuevo. Para cada tubo, se añaden 0,6 ml de cobre reactivo preparado como se describe por Milner y Avigad (Carbohydr. Res. 1967. 4:359-361), y luego la muestra se hierve durante 10 min y se enfría en hielo. Posteriormente, se añaden 0,4 ml de arseniomolibdato reactivo preparado como se describe por Nelson (Biol. Chem. 1944). Las muestras son mezcladas suavemente, se añaden 0,8 ml de H₂O, y la absorbancia a 600 nm es medida contra H₂O. Los controles son preparados haciendo hervir una mezcla de ensayo completo a tiempo cero, antes de la incubación a 40 °C. Un control de sustrato es hecho añadiendo agua en vez de solución enzimática.

Especificidad de la alfa-glucuronidasa

[0150] La especificidad de las alfa-glucuronidasas de *P. aurantiogriseum* fue investigada mediante ¹H RMN. La enzima (0,7 µg EP/mg sustrato) fue incubada con oligómeros (10 mg/mL) a pH 5,5 (NaOAc 50 mM) durante toda la noche a 30 °C antes de ser inactivadas a 95 °C durante 20 min. Las muestras fueron liofilizadas y disueltas en D₂O (1 mL). Los espectros ¹H RMN fueron registrados en un Varian mercurio 400 MHz a 30 °C y 80 °C, respectivamente. Los datos fueron recogidos sobre 100 barridos y la señal de HDO fue usada como una señal de referencia (4.67 ppm). Los espectros no están adjuntados.

[0151] La alfa-glucuronidasa resultó ser activa en oligómeros xilo-sustituidos de 4-OMe-alfa-glucuronopiranosil generados por una GH10 xilanasa. No ha mostrado ninguna actividad en oligómeros formados por una GH11 xilanasa o en las sustancias poliméricas de xilano. Esto indica que la alfa-glucuronidasa tiene actividad en las unidades de xilosa de terminales del 4-OMe-GlcA sólo y ninguna actividad en los residuos de glucuronosida "internal".

LISTADO DE SECUENCIAS

[0152]

<110> Novozymes A/S

<120> Alfa-glucuronidasa de *Penicillium aurantiogriseum*

<130> 11346.204-WO

<160> 2

ES 2 439 257 T3

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

5 <211> 2508

<212> ADN

<213> *Penicillium aurantiogriseum*

<220>

10 <221> CDS

<222> (1)..(2508)

<400> 1

atg	cgt	gca	ctt	ctc	ttc	ttc	gcc	tcc	ttg	ggc	ttt	gca	gcc	gct	gag	48
Met	Arg	Ala	Leu	Leu	Phe	Phe	Ala	Ser	Leu	Gly	Phe	Ala	Ala	Ala	Glu	
1				5					10					15		
aac	ggc	ctc	aat	ggc	tgg	ctg	cgg	tac	gca	tca	tta	ccc	tgt	tca	ggc	96
Asn	Gly	Leu	Asn	Gly	Trp	Leu	Arg	Tyr	Ala	Ser	Leu	Pro	Cys	Ser	Gly	
			20					25					30			
caa	tgt	cat	ccc	aac	ctc	cct	tcg	agt	atc	gtc	acc	ctc	aat	gcg	act	144
Gln	Cys	His	Pro	Asn	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Val	Thr	Leu	Asn	Ala	Thr	
		35					40					45				
gag	aca	agt	ccg	gta	tat	gtt	gcg	ggg	acg	gag	ttg	caa	agt	ggt	ctc	192
Glu	Thr	Ser	Pro	Val	Tyr	Val	Ala	Gly	Thr	Glu	Leu	Gln	Ser	Gly	Leu	
	50				55						60					
aaa	ggc	gtt	tat	ggg	aag	agt	gtc	caa	gtc	gca	cac	aac	aag	tgc	aag	240
Lys	Gly	Val	Tyr	Gly	Lys	Ser	Val	Gln	Val	Ala	His	Asn	Lys	Cys	Lys	
65				70				75						80		
aca	tcc	tcc	tcg	gtt	gtt	gtt	ggc	acg	gtt	gat	caa	tat	cgg	gaa	agc	288
Thr	Ser	Ser	Ser	Val	Val	Val	Gly	Thr	Val	Asp	Gln	Tyr	Arg	Glu	Ser	
				85				90						95		
tgt	ggc	cct	gtg	aaa	aac	gta	ccc	gaa	ctg	gaa	gaa	gat	ggc	ttc	tgg	336
Cys	Gly	Pro	Val	Lys	Asn	Val	Pro	Glu	Leu	Glu	Glu	Asp	Gly	Phe	Trp	
			100					105					110			
ctc	gat	acc	aag	ggg	gaa	aac	gtt	caa	atc	ctt	ggg	caa	aac	gag	agg	384
Leu	Asp	Thr	Lys	Gly	Glu	Asn	Val	Gln	Ile	Leu	Gly	Gln	Asn	Glu	Arg	
		115					120					125				
ggt	gct	ctc	tat	ggc	acc	ttt	gaa	tac	ttg	tcg	atg	ctc	gca	cag	gga	432
Gly	Ala	Leu	Tyr	Gly	Thr	Phe	Glu	Tyr	Leu	Ser	Met	Leu	Ala	Gln	Gly	
	130					135					140					
aac	ttc	tcc	aag	gtc	gca	tat	gcg	tcc	aat	cct	tct	gcc	cca	att	cgc	480
Asn	Phe	Ser	Lys	Val	Ala	Tyr	Ala	Ser	Asn	Pro	Ser	Ala	Pro	Ile	Arg	
145				150					155					160		
tgg	gtg	aat	caa	tgg	gat	gac	ctg	gat	gga	aga	atc	gaa	cgc	ggc	tat	528
Trp	Val	Asn	Gln	Trp	Asp	Asp	Leu	Asp	Gly	Arg	Ile	Glu	Arg	Gly	Tyr	
				165					170					175		
ggt	ggc	ccc	tct	atc	ttc	ttc	aag	gac	ggt	caa	atc	gtc	gac	gac	cta	576
Gly	Gly	Pro	Ser	Ile	Phe	Phe	Lys	Asp	Gly	Gln	Ile	Val	Asp	Asp	Leu	

15

ES 2 439 257 T3

180				185				190								
aca	cgg	ggt	act	gaa	tac	gcc	cgt	ttg	ttg	gcc	tcg	atc	aga	atc	aat	624
Thr	Arg	Val	Thr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Leu	Leu	Ala	Ser	Ile	Arg	Ile	Asn	
		195					200					205				
gct	gtc	gtc	att	aac	aat	gtc	aat	gcg	gat	gct	gct	ctc	ttg	aat	tcc	672
Ala	Val	Val	Ile	Asn	Asn	Val	Asn	Ala	Asp	Ala	Ala	Leu	Leu	Asn	Ser	
	210					215					220					
aca	aac	ctc	gac	ggc	gtg	gct	cga	atc	gct	gat	gtc	ttc	cgc	cca	tac	720
Thr	Asn	Leu	Asp	Gly	Val	Ala	Arg	Ile	Ala	Asp	Val	Phe	Arg	Pro	Tyr	
					230					235					240	
ggt	ata	caa	gtc	ggc	cta	tcg	ctc	aat	ttc	gca	tcc	cct	aaa	acg	gat	768
Gly	Ile	Gln	Val	Gly	Leu	Ser	Leu	Asn	Phe	Ala	Ser	Pro	Lys	Thr	Asp	
				245					250					255		
gga	gga	ctc	aac	act	ttt	gat	ccc	ctc	gat	gca	tct	gtc	atc	gag	tgg	816
Gly	Gly	Leu	Asn	Thr	Phe	Asp	Pro	Leu	Asp	Ala	Ser	Val	Ile	Glu	Trp	
			260					265					270			
tgg	tcg	aat	att	aca	acc	cag	gtc	tat	gag	cga	gtt	cct	gac	atg	gct	864
Trp	Ser	Asn	Ile	Thr	Thr	Gln	Val	Tyr	Glu	Arg	Val	Pro	Asp	Met	Ala	
		275					280					285				
ggc	tat	ctg	gtc	aag	gct	gac	tcg	gag	gga	gag	cca	ggc	ccc	cag	aca	912
Gly	Tyr	Leu	Val	Lys	Ala	Asp	Ser	Glu	Gly	Glu	Pro	Gly	Pro	Gln	Thr	
	290					295					300					
tat	aac	aga	acg	ctc	gca	gaa	gcg	gcg	aac	ctt	ttc	gcc	aaa	gaa	gtc	960
Tyr	Asn	Arg	Thr	Leu	Ala	Glu	Ala	Ala	Asn	Leu	Phe	Ala	Lys	Glu	Val	
					310					315					320	
cag	ccc	tac	ggt	ggc	att	ggt	atg	tat	cgc	gcg	ttt	gtc	tac	aat	aag	1008
Gln	Pro	Tyr	Gly	Gly	Ile	Val	Met	Tyr	Arg	Ala	Phe	Val	Tyr	Asn	Lys	
				325					330					335		
cta	aac	gaa	tca	atc	tgg	acg	gat	gat	cgt	gca	aag	gct	gcc	gtg	gga	1056
Leu	Asn	Glu	Ser	Ile	Trp	Thr	Asp	Asp	Arg	Ala	Lys	Ala	Ala	Val	Gly	
			340				345						350			
ttt	ttc	aag	gat	cta	gat	ggc	gaa	ttt	gac	gac	aat	gtg	gtg	atc	caa	1104
Phe	Phe	Lys	Asp	Leu	Asp	Gly	Glu	Phe	Asp	Asp	Asn	Val	Val	Ile	Gln	
		355				360						365				
atc	aag	tac	ggg	cct	att	gat	ttc	cag	gtc	cgt	gaa	cca	gca	tcg	gca	1152
Ile	Lys	Tyr	Gly	Pro	Ile	Asp	Phe	Gln	Val	Arg	Glu	Pro	Ala	Ser	Ala	
		370				375					380					
ttg	ttt	gca	aat	ttg	ttc	aac	acc	agc	atg	gcc	att	gaa	cta	cag	gtt	1200
Leu	Phe	Ala	Asn	Leu	Phe	Asn	Thr	Ser	Met	Ala	Ile	Glu	Leu	Gln	Val	
					390					395					400	
acg	caa	gaa	tat	ctt	gga	caa	cag	tcg	cat	ttg	gtc	tat	gtt	gct	cct	1248
Thr	Gln	Glu	Tyr	Leu	Gly	Gln	Gln	Ser	His	Leu	Val	Tyr	Val	Ala	Pro	
				405					410				415			
ctt	tgg	aag	acg	atc	tta	gac	tct	gac	ctc	cgc	gtc	gac	ggc	cag	cca	1296
Leu	Trp	Lys	Thr	Ile	Leu	Asp	Ser	Asp	Leu	Arg	Val	Asp	Gly	Gln	Pro	
			420					425					430			
tca	ctc	ggt	cgc	gat	att	gtg	act	ggt	aaa	cgg	ttc	aat	cgc	aaa	ctg	1344
Ser	Leu	Val	Arg	Asp	Ile	Val	Thr	Gly	Lys	Arg	Phe	Asn	Arg	Lys	Leu	
		435				440						445				
ggt	gga	tca	gca	gct	ggt	gtc	aac	gtg	ggc	aca	aac	acc	acc	tgg	ctt	1392
Gly	Gly	Ser	Ala	Ala	Val	Val	Asn	Val	Gly	Thr	Asn	Thr	Thr	Trp	Leu	
		450				455					460					

ES 2 439 257 T3

ggt Gly 465	agc Ser	cac His	ctg Leu	tct Ser	atg Met 470	tca Ser	aat Asn	cta Leu	tat Tyr	gcc Ala 475	tac Tyr	ggt Gly	cgc Arg	tta Leu	gct Ala 480	1440
tgg Trp	aac Asn	cca Pro	gca Ala	gat Asp 485	gat Asp	gcc Ala	caa Gln	gac Asp	att Ile 490	ctg Leu	caa Gln	gac Asp	tgg Trp	atc Ile 495	aga Arg	1488
ctg Leu	acc Thr	ttt Phe	ggg Gly 500	ctc Leu	gac Asp	cgg Arg	aag Lys	gta Val 505	ctt Leu	gac Asp	acc Thr	atc Ile	act Thr 510	cgc Arg	atg Met	1536
tcc Ser	atg Met	gaa Glu 515	tct Ser	tgg Trp	ccc Pro	gcc Ala	tac Tyr 520	gaa Glu	caa Gln	tac Tyr	agt Ser	ggg Gly 525	aat Asn	ttg Leu	ggc Gly	1584
ata Ile	cag Gln 530	act Thr	tta Leu	aca Thr	gat Asp	att Ile 535	tta Leu	tac Tyr	act Thr	cac His	tat Tyr 540	ggt Gly	ccc Pro	aac Asn	cct Pro	1632
gca Ala 545	tcc Ser	caa Gln	gac Asp	aac Asn	aat Asn 550	gga Gly	tgg Trp	ggc Gly	caa Gln	tgg Trp 555	acc Thr	cgc Arg	gca Ala	gac Asp	caa Gln 560	1680
acc Thr	agt Ser	att Ile	gga Gly	atg Met 565	gat Asp	cgg Arg	aca Thr	gtg Val	gca Ala 570	aac Asn	ggc Gly	aca Thr	ggc Gly	ttt Phe 575	tcg Ser	1728
ggc Gly	cag Gln	tat Tyr	ccg Pro 580	gat Asp	gaa Glu	atc Ile	gct Ala	gcc Ala 585	atg Met	tat Tyr	gag Glu	aac Asn	atc Ile 590	gac Asp	acc Thr	1776
acg Thr	cca Pro	gac Asp 595	gat Asp	ctt Leu	cta Leu	cta Leu	tgg Trp 600	ttc Phe	cac His	cat His	gtg Val	aaa Lys 605	tac Tyr	acc Thr	cat His	1824
cgt Arg 610	ctg Leu	cac His	tcg Ser	ggg Gly	aag Lys	acc Thr 615	gtt Val	att Ile	caa Gln	cac His	ttc Phe 620	tac Tyr	gat Asp	gaa Glu	cac His	1872
tac Tyr 625	agc Ser	ggg Gly	gcg Ala	gaa Glu	act Thr 630	gca Ala	cag Gln	aca Thr	ttc Phe	ctt Leu 635	acg Thr	caa Gln	tgg Trp	gaa Glu	tca Ser 640	1920
ctt Leu	cat His	ggc Gly	aaa Lys	att Ile 645	gat Asp	gct Ala	gag Glu	cga Arg	tac Tyr 650	aat Asn	cat His	act Thr	cgg Arg	cac His 655	ttc Phe	1968
cta Leu	gac Asp	tac Tyr	cag Gln 660	agc Ser	ggt Gly	cac His	tca Ser	att Ile 665	gtg Val	tgg Trp	aga Arg	gat Asp	gcg Ala 670	att Ile	aat Asn	2016
gac Asp	ttc Phe	tat Tyr 675	tac Tyr	aat Asn	ctt Leu	tcc Ser	ggg Gly 680	atc Ile	cct Pro	gat Asp	gag Glu	gcc Ala 685	aag Lys	cgt Arg	gtc Val	2064
ggc Gly	cac His 690	cac His	cca Pro	tgg Trp	cgc Arg	atc Ile 695	gaa Glu	gcg Ala	gaa Glu	gat Asp	atg Met 700	aag Lys	tta Leu	gag Glu	ggc Gly	2112
tac Tyr 705	aaa Lys	act Thr	tac Tyr	acc Thr	gtc Val 710	agc Ser	ccc Pro	ttc Phe	gaa Glu	aca Thr 715	gct Ala	tct Ser	ggt Gly	tcg Ser	gtt Val 720	2160
gcc Ala	att Ile	gtt Val	aca Thr	act Thr 725	tcc Ser	aac Asn	agt Ser	aca Thr	gcc Ala 730	ggc Gly	acc Thr	gct Ala	tca Ser	acc Thr 735	aaa Lys	2208

ES 2 439 257 T3

ata aac ttt ccc tct ggc acc tat gac ctt gca gtg aac tac tac gat	2256
Ile Asn Phe Pro Ser Gly Thr Tyr Asp Leu Ala Val Asn Tyr Tyr Asp	
740 745 750	
gta tac ggt ggc cag tcg cag tgg agg gtc tat ctg aat aat cag gaa	2304
Val Tyr Gly Gly Gln Ser Gln Trp Arg Val Tyr Leu Asn Asn Gln Glu	
755 760 765	
atc ggc caa tgg gtt ggc aat agt gag gat acc ttc agc cac aca cct	2352
Ile Gly Gln Trp Val Gly Asn Ser Glu Asp Thr Phe Ser His Thr Pro	
770 775 780	
tct gtc tat ttg gac gga cat tcg gcg att cgt att aag ttc cgg ggt	2400
Ser Val Tyr Leu Asp Gly His Ser Ala Ile Arg Ile Lys Phe Arg Gly	
785 790 795 800	
gtc gaa atc cac aag ggt gat act ttg aag att gtc ggt atg cct gat	2448
Val Glu Ile His Lys Gly Asp Thr Leu Lys Ile Val Gly Met Pro Asp	
805 810 815	
ggc act gag ccg gcg cca ttg gac tat gtg gct ttg ctg ccg gcg ggt	2496
Gly Thr Glu Pro Ala Pro Leu Asp Tyr Val Ala Leu Leu Pro Ala Gly	
820 825 830	
att gta gat tag	2508
Ile Val Asp	
835	

<210> 2

<211> 835

5 <212> PRT

<213> *Penicillium aurantiogriseum*

<400> 2

10

ES 2 439 257 T3

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

ES 2 439 257 T3

130						135						140			
Asn 145	Phe	Ser	Lys	Val	Ala 150	Tyr	Ala	Ser	Asn	Pro 155	Ser	Ala	Pro	Ile	Arg 160
Trp	Val	Asn	Gln	Trp 165	Asp	Asp	Leu	Asp	Gly 170	Arg	Ile	Glu	Arg	Gly 175	Tyr
Gly	Gly	Pro	Ser 180	Ile	Phe	Phe	Lys	Asp 185	Gly	Gln	Ile	Val	Asp	Asp	Leu
Thr	Arg	Val 195	Thr	Glu	Tyr	Ala	Arg 200	Leu	Leu	Ala	Ser	Ile 205	Arg	Ile	Asn
Ala	Val 210	Val	Ile	Asn	Asn	Val 215	Asn	Ala	Asp	Ala	Ala 220	Leu	Leu	Asn	Ser
Thr	Asn	Leu	Asp	Gly	Val 230	Ala	Arg	Ile	Ala	Asp 235	Val	Phe	Arg	Pro	Tyr 240
Gly	Ile	Gln	Val	Gly 245	Leu	Ser	Leu	Asn	Phe 250	Ala	Ser	Pro	Lys	Thr	Asp 255
Gly	Gly	Leu	Asn 260	Thr	Phe	Asp	Pro	Leu 265	Asp	Ala	Ser	Val	Ile 270	Glu	Trp
Trp	Ser	Asn 275	Ile	Thr	Thr	Gln	Val 280	Tyr	Glu	Arg	Val	Pro 285	Asp	Met	Ala
Gly	Tyr 290	Leu	Val	Lys	Ala	Asp 295	Ser	Glu	Gly	Glu	Pro 300	Gly	Pro	Gln	Thr
Tyr 305	Asn	Arg	Thr	Leu	Ala 310	Glu	Ala	Ala	Asn	Leu 315	Phe	Ala	Lys	Glu	Val 320
Gln	Pro	Tyr	Gly	Gly 325	Ile	Val	Met	Tyr	Arg 330	Ala	Phe	Val	Tyr	Asn 335	Lys
Leu	Asn	Glu	Ser 340	Ile	Trp	Thr	Asp	Asp 345	Arg	Ala	Lys	Ala	Ala 350	Val	Gly
Phe	Phe	Lys 355	Asp	Leu	Asp	Gly	Glu 360	Phe	Asp	Asp	Asn	Val 365	Val	Ile	Gln
Ile 370	Lys	Tyr	Gly	Pro	Ile	Asp 375	Phe	Gln	Val	Arg	Glu 380	Pro	Ala	Ser	Ala
Leu 385	Phe	Ala	Asn	Leu	Phe 390	Asn	Thr	Ser	Met	Ala 395	Ile	Glu	Leu	Gln	Val 400
Thr	Gln	Glu	Tyr	Leu 405	Gly	Gln	Gln	Ser	His 410	Leu	Val	Tyr	Val	Ala 415	Pro

ES 2 439 257 T3

Leu Trp Lys Thr Ile Leu Asp Ser Asp Leu Arg Val Asp Gly Gln Pro
 420 425 430
 Ser Leu Val Arg Asp Ile Val Thr Gly Lys Arg Phe Asn Arg Lys Leu
 435 440 445
 Gly Gly Ser Ala Ala Val Val Asn Val Gly Thr Asn Thr Thr Trp Leu
 450 455 460
 Gly Ser His Leu Ser Met Ser Asn Leu Tyr Ala Tyr Gly Arg Leu Ala
 465 470 475 480
 Trp Asn Pro Ala Asp Asp Ala Gln Asp Ile Leu Gln Asp Trp Ile Arg
 485 490 495
 Leu Thr Phe Gly Leu Asp Arg Lys Val Leu Asp Thr Ile Thr Arg Met
 500 505 510
 Ser Met Glu Ser Trp Pro Ala Tyr Glu Gln Tyr Ser Gly Asn Leu Gly
 515 520 525
 Ile Gln Thr Leu Thr Asp Ile Leu Tyr Thr His Tyr Gly Pro Asn Pro
 530 535 540
 Ala Ser Gln Asp Asn Asn Gly Trp Gly Gln Trp Thr Arg Ala Asp Gln
 545 550 555 560
 Thr Ser Ile Gly Met Asp Arg Thr Val Ala Asn Gly Thr Gly Phe Ser
 565 570 575
 Gly Gln Tyr Pro Asp Glu Ile Ala Ala Met Tyr Glu Asn Ile Asp Thr
 580 585 590
 Thr Pro Asp Asp Leu Leu Leu Trp Phe His His Val Lys Tyr Thr His
 595 600 605
 Arg Leu His Ser Gly Lys Thr Val Ile Gln His Phe Tyr Asp Glu His
 610 615 620
 Tyr Ser Gly Ala Glu Thr Ala Gln Thr Phe Leu Thr Gln Trp Glu Ser
 625 630 635 640
 Leu His Gly Lys Ile Asp Ala Glu Arg Tyr Asn His Thr Arg His Phe
 645 650 655
 Leu Asp Tyr Gln Ser Gly His Ser Ile Val Trp Arg Asp Ala Ile Asn
 660 665 670
 Asp Phe Tyr Tyr Asn Leu Ser Gly Ile Pro Asp Glu Ala Lys Arg Val
 675 680 685

ES 2 439 257 T3

Gly His His Pro Trp Arg Ile Glu Ala Glu Asp Met Lys Leu Glu Gly
 690 695 700
 Tyr Lys Thr Tyr Thr Val Ser Pro Phe Glu Thr Ala Ser Gly Ser Val
 705 710 715 720
 Ala Ile Val Thr Thr Ser Asn Ser Thr Ala Gly Thr Ala Ser Thr Lys
 725 730 735
 Ile Asn Phe Pro Ser Gly Thr Tyr Asp Leu Ala Val Asn Tyr Tyr Asp
 740 745 750
 Val Tyr Gly Gly Gln Ser Gln Trp Arg Val Tyr Leu Asn Asn Gln Glu
 755 760 765
 Ile Gly Gln Trp Val Gly Asn Ser Glu Asp Thr Phe Ser His Thr Pro
 770 775 780
 Ser Val Tyr Leu Asp Gly His Ser Ala Ile Arg Ile Lys Phe Arg Gly
 785 790 795 800
 Val Glu Ile His Lys Gly Asp Thr Leu Lys Ile Val Gly Met Pro Asp
 805 810 815
 Gly Thr Glu Pro Ala Pro Leu Asp Tyr Val Ala Leu Leu Pro Ala Gly
 820 825 830
 Ile Val Asp
 835

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido aislado con actividad de alfa-glucuronidasa, seleccionado del grupo que consiste en:
 - 5 (a) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos con al menos un 85%, preferiblemente al menos un 90%, y de la forma más preferible al menos un 95% de identidad con el polipéptido maduro de SEC ID n.º:2;
 - 10 (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que hibridiza bajo al menos condiciones de astringencia altísimas con (i) la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n.º:1, (ii) secuencia de ADN genómico que comprende la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.º:1, o (iii) una cadena complementaria en toda su longitud a (i) o (ii);
 - 15 (c) un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos un 85%, preferiblemente al menos un 90%, y de la forma más preferible al menos un 95% de identidad con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1.
2. Polipéptido según la reivindicación 1, que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID n.º:2 o un fragmento de la misma que tiene actividad de alfa-glucuronidasa.
- 20 3. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende o consiste en el polipéptido maduro de SEC ID n.º:2.
4. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que se codifica por un polinucleótido que comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos de SEC ID n.º:1 o una subsecuencia de la misma que codifica un fragmento con actividad de alfa-glucuronidasa.
- 25 5. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que se codifica por un polinucleótido que comprende o consiste en la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n.º:1.
- 30 6. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el polipéptido maduro consiste en los aminoácidos 1 a 835 de SEC ID n.º:2.
7. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la secuencia codificante de polipéptido maduro consiste en los nucleótidos 1 a 2508 de SEC ID n.º:1.
- 35 8. Polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Constructo de ácidos nucleicos que comprende el polinucleótido según la reivindicación 8 operativamente enlazado a una o más (varias) secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un huésped de expresión.
- 40 10. Vector de expresión recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos según la reivindicación 9.
11. Célula huésped recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos según la reivindicación 9.
- 45 12. Método para producir el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende: (a) cultivo de una célula, que en su forma tipo salvaje produce el polipéptido, bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.
- 50 13. Método para producir el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende: (a) cultivo de una célula huésped que comprende un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.
14. Método para producir el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende: (a) cultivo una planta o una célula de planta transgénica que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.
- 55 15. Planta transgénica, parte de planta o célula vegetal transformada con un polinucleótido que codifica el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 60 16. Método para producir una proteína, que comprende: (a) cultivo de la célula huésped recombinante de la reivindicación 11 bajo condiciones propicias para la producción de la proteína; y (b) recuperación la proteína.
- 65 17. Método para degradar o convertir un material de biomasa, que comprende tratar el material con el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

18. Método según la reivindicación 17, que comprende además tratar el material de biomasa que comprende grupos feruloil con una enzima seleccionada del grupo que consiste en una xilanasa, una arabinofuranosidasa, una xilosidasa, una glucuronidasa, y una combinación de las mismas.
- 5 19. Método según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, donde el material de biomasa es un pienso para animales.
20. Método según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, donde el material de biomasa es una biomasa celulósica.
- 10 21. Composición que comprende el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y una o más enzima(s) seleccionada(s) de acetilxilano esterasa, ácido ferúlico esterasa, xilanasa, arabinofuranosidasa y xilosidasa.
22. Uso del polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o la composición según la reivindicación 21 en un proceso para la hidrólisis de un material de biomasa que comprende poner en contacto dicha biomasa con dicho polipéptido o dicha composición.
- 15 23. Uso según la reivindicación 22 en un proceso para producir etanol.
24. Uso según la reivindicación 22 en un proceso para producir pienso para animales.