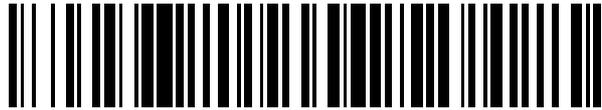


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 494**

51 Int. Cl.:

C12N 9/52 (2006.01)
C12N 15/57 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
A23K 1/165 (2006.01)
A23L 1/305 (2006.01)
C11D 3/386 (2006.01)
A23K 1/18 (2006.01)
A23J 3/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2005 E 10180267 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2015 EP 2258839**

54 Título: **Proteasas**

30 Prioridad:

21.06.2004 DK 200400969

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

11.09.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LASSEN, SOEREN FLENSTED;
SJOEHOLM, CARSTEN;
OESTERGAARD, PETER RAHBEK y
FISCHER, MORTEN**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 545 494 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proteasas

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere a polipéptidos aislados con actividad de proteasa y secuencias de ácidos nucleicos aisladas que codifican los polipéptidos. La invención también se refiere a construcciones de ácidos nucleicos, vectores y células huésped, incluyendo células de plantas y animales, comprendiendo las secuencias de ácidos nucleicos, al igual que métodos para producción y uso de los polipéptidos, en particular, el uso de los polipéptidos en alimento para animales y detergentes.

Antecedentes de la invención

15 [0002] Proteasas derivadas de *Nocardiopsis* sp. NRRL 18262 y *Nocardiopsis dassonvillei* NRRL 18133 se describen en la WO 88/03947. El ADN y secuencias de aminoácidos de la proteasa derivados de *Nocardiopsis* sp. NRRL 18262 se muestran en DK aplicación nº 1996 00013. La WO 01/58276 divulga el uso en alimento para animales de proteasas de ácido estables relacionadas con la proteasa derivada de *Nocardiopsis* sp. NRRL 18262, al igual que una proteasa derivada de *Nocardiopsis alba* DSM 14010.

20 [0003] La JP 2-255081-A divulga una proteasa derivada de *Nocardiopsis* sp. cepa OPC-210 (FERM P-10508), sin embargo, sin información de secuencia. La cepa ya no está disponible, ya que el depósito se retiró.

25 [0004] La DD 200432|8 divulga una preparación proteolítica derivada de *Nocardiopsis dassonvillei* cepa ZIMET 43647, sin embargo, sin información de secuencia. La cepa parece no estar ya disponible.

[0005] La JP 2003284571-A divulga la secuencia de aminoácidos y la secuencia de ADN correspondiente de una proteasa derivada de *Nocardiopsis* sp. TOA-1 (FERM P-18676). La secuencia se ha introducido en GENESEQP con nº ADF43564.

30 [0006] Es un objeto de la presente invención proporcionar proteasas alternativas, en particular, para uso en alimento para animales y/o detergentes.

Resumen de la invención

35 [0007] Varias proteasas se clonaron, purificaron y caracterizaron. Estas proteasas se designan de la siguiente manera: proteasa L1a derivadas de *Nocardiopsis dassonvillei* subesp. *dassonvillei* DSM 43235 (ver SEC ID nº 1 y 2); proteasa L1b derivada de *Nocardiopsis prasina* DSM 15649 (ver SEC ID nº: 3 y 4); proteasa L1c derivada de *Nocardiopsis prasina* (previamente *alba*) DSM 14010 (ver SEC ID nº: 5 y 6); proteasa L2a derivada de *Nocardiopsis* sp. DSM 16424 (ver SEC ID nº: 7 y 8); proteasa L2b derivada de *Nocardiopsis alkaliphila* DSM 44657 (ver SEC ID nº: 9 y 10); y proteasa L2c derivada de *Nocardiopsis lucentensis* DSM 44048 (ver SEC ID nº: 11 y 12).

[0008] La presente invención se refiere a:

45 Un polipéptido aislado con actividad de proteasa, que muestra i) una actividad relativa a 15°C y un pH 9 de al menos 0,8, ii) una actividad relativa a 25°C y un pH 9 de al menos 0,10; y/o iii) una actividad relativa a 37°C y un pH 9 de al menos 0,20, donde la actividad se compara a la actividad a la temperatura óptima de la misma proteasa; seleccionado del grupo que consiste en:

50 (a) un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que tiene un grado de identidad para aminoácidos 1-192 de la SEC ID nº: 4 o aminoácidos 1-192 de la SEC ID nº 6 de al menos 80%; y
(b) un fragmento de (a) que tiene actividad de proteasa.

55 [0009] La invención también se refiere a secuencias de ácidos nucleicos aisladas que codifican los polipéptidos anteriores y a construcciones de ácidos nucleicos, vectores y células huésped comprendiendo las secuencias de ácidos nucleicos al igual que métodos para producción y uso de los polipéptidos, en particular, en alimento para animales y detergentes.

Descripción detallada de la invención60 **Polipéptidos con actividad de proteasa**

[0010] Polipéptidos con actividad de proteasa, o proteasas, se designan también a veces también peptidasas, proteinasas, hidrolasas peptídicas o enzimas proteolíticas. Las proteasas pueden ser del tipo exo que hidrolizan péptidos empezando en cualquier extremo de estos, o del tipo endo que actúan internamente en las cadenas

polipeptídicas (endopeptidasas). Endopeptidasas muestran actividad en sustratos de péptido bloqueados N- y C-terminalmente que son pertinentes para la especificidad de la proteasa en cuestión.

[0011] El término "proteasa" se define aquí como una enzima que hidroliza enlaces peptídicos. Incluye cualquier enzima que pertenece al grupo enzimático EC 3.4 (incluyendo cada una de las trece subclases de esta). El número EC se refiere a Enzyme Nomenclature 1992 de NC-IUBMB, Academic Press, San Diego, California, incluyendo suplementos 1-5 publicados en *Eur. J. Biochem.* 1994, 223, 1-5; *Eur. J. Biochem.* 1995, 232, 1-6; *Eur. J. Biochem.* 1996, 237, 1-5; *Eur. J. Biochem.* 1997, 250, 1-6; y *Eur. J. Biochem.* 1999, 264, 610-650 respectivamente. La nomenclatura es regularmente complementada y actualizada; ver, por ejemplo, la World Wide Web (WWW) en <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/index.html>.

[0012] Las proteasas se clasifican basándose en sus mecanismos catalíticos en los siguientes grupos: Serina proteasas (S), Cisteína proteasas (C), Proteasas aspárticas (A), Metalo proteasas (M), y Proteasas desconocidas, o aún sin clasificar (U), véase *Handbook of Proteolytic Enzymes*, A.J.Barrett, N.D.Rawlings, J.F.Woessner (eds), Academic Press (1998), en particular la parte de introducción general.

[0013] En una forma de realización particular, las proteasas se seleccionan del grupo que consiste en:

- (a) proteasas del grupo enzimático EC 3.4.-.-;
- (b) serina proteasas del grupo S del manual anterior;
- (c) serina proteasas de la familia de peptidasa S2A; y/o
- (d) serina proteasas de la familia de peptidasa S1 E como se describe en *Biochem.J.* 290:205-218 (1993) y en *MEROPS protease database, release 6.20, March 24, 2003*, (www.merops.ac.uk). La base de datos se describe en Rawlings, N.D., O'Brien, E. A. & Barrett, A.J. (2002) *MEROPS: the protease database.Nucleic Acids Res.* 30, 343-346.

[0014] Para determinar si una proteasa dada es una serina proteasa, y una familia de proteasa S2A, se hace referencia al manual anterior y a los principios indicados en este. Tal determinación puede llevarse a cabo para todo tipo de proteasas, sean proteasas de origen natural o de tipo salvaje; o creadas genéticamente o proteasas sintéticas.

[0015] Actividad de proteasa puede medirse usando cualquier ensayo, en el que un sustrato se emplea, que incluye enlaces peptídicos pertinentes para la especificidad de la proteasa en cuestión. PH de ensayo y temperatura de ensayo se adaptan asimismo a la proteasa en cuestión. Ejemplos de valores de pH de ensayo son pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12. Ejemplos de temperaturas de ensayo son 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 90, o 95°C.

[0016] Ejemplos de sustratos de proteasa son caseína, como caseína entrecruzada con azurina (caseína AZCL). Tres ensayos de proteasa se describen en los ejemplos 4-5 aquí, cualquiera de los cuales se puede usar para determinar actividad de proteasa. Para los fines de esta invención, el ensayo denominado pNA es un ensayo preferido.

[0017] No hay limitaciones en el origen de la proteasa de la invención y/o para uso según la invención. Así, el término proteasa incluye no solo proteasas naturales o de tipo salvaje obtenidas de microorganismos de cualquier género, sino también cualquier mutaciones, variantes, fragmentos etc. de estas que muestran actividad de proteasa, al igual que proteasas sintéticas, como proteasas transpuestas y proteasas de consenso. Tales proteasas creadas genéticamente se pueden preparar como se conoce generalmente en la técnica, por ejemplo, por mutagénesis dirigida, por PCR (usando un fragmento de PCR con la mutación deseada como uno de los cebadores en las reacciones de la PCR), o por mutagénesis aleatoria. La preparación de proteínas de consenso se describe en, por ejemplo, el documento EP 897985. Transposición de genes se describe generalmente en, por ejemplo, los documentos WO 95/22625 y WO 96/00343. Recombinación de genes de proteasa puede hacerse independientemente de la secuencia específica de los progenitores por transposición sintética como se describe en Ness, J.E. et al, en *Nature Biotechnology*, Vol. 20 (12), pp. 1251-1255, 2002. Oligonucleótidos sintéticos degenerados en su secuencia de ADN para proporcionar la posibilidad de que todos los aminoácidos encontrados en el conjunto de proteasas progenitoras se diseñan y los genes se ensamblan según la referencia. La transposición puede llevarse a cabo para la secuencia de longitud completa o para solo parte de la secuencia y luego más tarde combinada con el resto del gen para dar una secuencia de longitud completa. Las proteasas de las SEC ID n°: 2, 4, 6, 8, 10, y 12, al igual que las proteasas de *Nocardiosis* descritas en los documentos previos catalogados anteriormente, son ejemplos particulares de tales proteasas progenitoras que se pueden someter a transposición como se ha descrito anteriormente, para proporcionar proteasas adicionales de la invención. El término "obtenido de" como se utiliza en este caso en relación con una fuente dada debe significar que el polipéptido codificado por la secuencia de ácidos nucleicos se produce por la fuente o por una célula en la que está presente la secuencia de ácidos nucleicos de la fuente. En una forma de realización preferida, el polipéptido es segregado extracelularmente.

[0018] En una forma de realización específica, la proteasa es una variante hipoalérgica, diseñada para invocar una respuesta inmunológica reducida cuando se expone a animales, incluyendo al hombre. El término respuesta inmunológica debe entenderse como cualquier reacción del sistema inmunológico de un animal expuesto a la proteasa. Un tipo de respuesta inmunológica es una respuesta alérgica llevando a niveles aumentados de IgE en el animal expuesto. Variantes hipoalérgicas pueden prepararse usando técnicas conocidas en el técnica. Por ejemplo, la proteasa se puede conjugar con partes de protección de fracciones poliméricas o epítomos de la proteasa implicada en una respuesta inmunológica. Conjugación con polímeros puede implicar acoplamiento químico *in vitro* de polímero a la proteasa, por ejemplo, como se describe en los documentos WO 96/17929, WO 98/30682, WO 98/35026, y/o WO 99/00489. Conjugación puede en adición o alternativamente a esto implicar acoplamiento *in vivo* de polímeros a la proteasa. Tal conjugación se puede conseguir por ingeniería genética de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteasa, por inserción de sitios de glicosilación de codificación de secuencias de consenso adicionales en la proteasa y expresión la proteasa en un huésped capaz de glicosilación de la proteasa, ver, por ejemplo, WO 00/26354. Otra manera de provisión de variantes hipoalérgicas es ingeniería genética de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteasa para provocar que las proteasas se auto-oligomericen, provocando que monómeros de proteasa puedan proteger los epítomos de otros monómeros de proteasa y reduciendo así la antigenicidad de los oligómeros. Tales productos y su preparación se describe, por ejemplo, en WO 96/16177. Epítomos implicados en una respuesta inmunológica se pueden identificar por varios métodos, como el método de visualización de fago descrito en WO 00/26230 y WO 01/83559, o el método aleatorio descrito en EP 561907. Una vez un epítomo ha sido identificado, su secuencia de aminoácidos se puede alterar para producir propiedades inmunológicas alteradas de la proteasa por técnicas de manipulación de gen conocidas, como mutagénesis dirigida al sitio (ver, por ejemplo, WO 00/26230, WO 00/26354 y/o WO 00/22103) y/o conjugación de un polímero puede realizarse en proximidad suficiente al epítomo para que el polímero proteja el epítomo.

[0019] Varios aspectos de la presente invención se refieren a polipéptidos aislados con actividad de proteasa (para abreviar "proteasas"), al igual que las secuencias de ácidos nucleicos aisladas correspondientes, dichos polipéptidos, o ácidos nucleicos, respectivamente, comprendiendo una secuencia de aminoácidos, o una secuencia de ácidos nucleicos, respectivamente, con un cierto grado de identidad a un fragmento específico de una secuencia de aminoácidos, o una secuencia de ácidos nucleicos, respectivamente, con una SEC ID n° específica. Los fragmentos específicos corresponden a los polipéptidos maduros, o las partes de codificación de polipéptidos maduros de las secuencias de ácidos nucleicos, respectivamente.

[0020] Para fines de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos, al igual que el grado de identidad entre dos secuencias de nucleótidos, se determina por el programa "align" que es un alineamiento de Needleman- Wunsch (es decir, un alineamiento global). El programa se usa para alineamiento de polipéptido, al igual que secuencias de nucleótidos. La matriz de puntuación por defecto BLOSUM50 se usa para alineamientos de polipéptido y la matriz de identidad de por defecto se usa para alineamientos de nucleótido. La penalización para el primer residuo de un espacio es -12 para polipéptidos y -16 para nucleótidos. Las penalizaciones para otros residuos de un espacio son -2 para polipéptidos y -4 para nucleótidos.

[0021] "Align" es parte de la versión v20u6 del paquete FASTA (ver W. R. Pearson y D. J. Lipman (1988), "Improved Tools for Biological Sequence Analysis", PNAS 85:2444-2448, y W. R. Pearson (1990) "Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA," Methods in Enzymology 183:63- 98) Alineamientos de proteína FASTA usan el algoritmo de Smith-Waterman con ninguna limitación en tamaño del espacio (ver "Smith-Waterman algorithm", T. F. Smith and M. S. Waterman (1981) J. Mol. Biol. 147:195-197).

[0022] En formas de realización particulares, el polipéptido de la invención tiene un grado de identidad a las partes maduras de cualquiera de las SEC ID n° 4 o n° 6, de al menos 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o al menos 99%.

[0023] En otras formas de realización particulares, la secuencia de ácidos nucleicos de la invención tienen un grado de identidad a la parte de codificación de péptidos maduros de cualquiera de las SEC ID n° 3 o n° 5 de al menos 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o al menos 99%.

[0024] En otra forma distinta de realización particular, la proteasa de la invención comprende la secuencia de aminoácidos de las partes maduras de cualquiera de las SEC ID n°: 4 o 6, o un fragmento de estas que tiene actividad de proteasa.

[0025] En otra forma de realización preferida, los polipéptidos de la presente invención consisten en la parte de péptido maduro de una de cualquiera de las SEC ID n°: 4 o 6 ; o un fragmento de estas que tiene actividad de proteasa.

[0026] Un fragmento de cualquiera de las SEC ID n°: 4 o 6, es un polipéptido con uno o más aminoácidos eliminado del amino y/o carboxilo terminal de estas secuencias de aminoácidos. En una forma de realización, un fragmento contiene al menos 75 residuos de aminoácidos, o al menos 100 residuos de aminoácidos, o al menos 125 residuos

de aminoácidos, o al menos 150 residuos de aminoácidos, o al menos 160 residuos de aminoácidos, o al menos 165 residuos de aminoácidos, o al menos 170 residuos de aminoácidos, o al menos 175 residuos de aminoácidos.

5 [0027] Una variante alélica denota cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. Variación alélica surge naturalmente a través de mutación y puede suponer polimorfismo dentro de poblaciones. Mutaciones de gen pueden ser silenciosas (ningún cambio 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.

10 [0028] Las secuencias de ácidos nucleicos de cualquiera de las SEC ID n°: 3 o 5, o las partes de codificación de péptidos maduros de estas, o una subsecuencia de estas, al igual que las secuencias de aminoácidos de cualquiera de las SEC ID n°: 4 o 6, o un fragmento de estas, se pueden utilizar para el diseño de una sonda de ácido nucleico para identificar y clonar polipéptidos que codifican ADN con actividad de proteasa de cepas de este o géneros o especies diferentes según métodos bien conocidos en la técnica. En particular, tales sondas se pueden usar para
15 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 este. Tales sondas pueden ser considerablemente más cortas que la secuencia entera, pero debería ser al menos 15, preferiblemente al menos 25, y más preferiblemente al menos 35 nucleótidos de longitud. Sondas más largas también se puede usar. Ambas sondas de ADN y ARN pueden usarse. Las sondas se marcan típicamente para detectar el gen correspondiente (por
20 ejemplo, con ³²P, ³H, ³⁵S, biotina, o avidina).

[0029] Así, un ADN genómico o una genoteca de ADNc obtenida a partir de otros organismos se pueden seleccionar para ADN que hibridiza con las sondas anteriormente descritas y que codifica un polipéptido con actividad de proteasa. Genómico u otro ADN de otros organismos se pueden separar por agarosa o electroforesis en gel de
25 poliacrilamida, u otras técnicas de separación. ADN de las bibliotecas o el ADN separado se puede transferir a e inmovilizar en nitrocelulosa u otro material portador adecuado. Para identificar un clon o ADN que es homólogo a cualquiera de las SEC ID n°: 3 o 5, o una subsecuencia de estas, el material portador se usa en una transferencia de Southern. A efectos de la presente invención, hibridación indica que la secuencia de ácidos nucleicos hibridiza a una sonda de ácido nucleico marcada correspondiente a la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en cualquiera de
30 estas SEC ID n°, su cadena complementaria, o una subsecuencia de esta, bajo condiciones de astringencia de muy bajas a muy altas. Moléculas a la que la sonda de ácido nucleico hibridiza bajo estas condiciones son detectadas usando película radiográfica.

[0030] En una realización particular, la sonda de ácido nucleico es una secuencia de ácidos nucleicos que codifica
35 las partes de péptido maduro de cualquiera de las SEC ID n°: 4 o 6, o subsecuencias de estas. En otra forma de realización, la sonda de ácido nucleico es aquellos nucleótidos de cualquiera de las SEC ID n°: 3 o 5, que corresponden a las regiones de codificación de polipéptidos maduros.

[0031] Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, condiciones de astringencia de muy bajas a
40 muy altas se definen como prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 0,3% SDS, 200 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y cortado, y bien 25% de formamida para astringencias bajas y muy bajas, 35% de formamida para medio y astringencias medias altas, o 50% de formamida para astringencias altas y muy altas, seguido de procedimientos de transferencia de Southern estándar.

[0032] Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, el material portador se lava finalmente tres
45 veces cada una durante 15 minutos usando 2 x SSC, 0,2% SDS preferiblemente al menos a 45°C (astringencia muy baja), más preferiblemente al menos a 50°C (astringencia baja), más preferiblemente al menos a 55°C (astringencia media), más preferiblemente al menos a 60°C (astringencia media alta), incluso más preferiblemente al menos a
50 65°C (astringencia alta), y más preferiblemente al menos a 70°C (astringencia muy alta). Preferiblemente, el lavado se conduce usando bien 0,2 X SSC, 0,1 X SSC o 0,02 X SSC, las otras condiciones de lavado que no tienen modificaciones (es decir, lavar tres veces, cada una durante 15 minutos; incluyen 0,2% SDS, lavado preferiblemente al menos a 45°C (astringencia muy baja), más preferiblemente al menos a 50°C (astringencia baja), más preferiblemente al menos a 55°C (astringencia media), más preferiblemente al menos a 60°C (astringencia media alta), incluso más preferiblemente al menos a 65°C (astringencia alta), y más preferiblemente al menos a 70°C
55 (astringencia muy alta).

[0033] Para ondas cortas de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, condiciones de astringencia se definen como prehibridación, hibridación y post-hibridación de lavado de 5°C a 10°C
60 por debajo de la T_m calculada usando el cálculo según Bolton y McCarthy (1962, *Proceedings of the National Academy of Sciences EEUU 48:1390*) en 0,9 M de NaCl, 0,09 M de Tris-HCl, pH 7,6, 6 mM de EDTA, 0,5% de NP-40, solución de Denhardt 1X, 1 mM de pirofosfato de sodio, 1 mM de fosfato monobásico de sodio, 0,1 mM de ATP y 0,2 mg de levadura ARN por ml siguiendo procedimientos de transferencia de Southern estándar.

[0034] Para sondas cortas de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, el
65 material portador se lava una vez en 6X SSC más 0,1% de SDS durante 15 minutos y dos veces cada durante 15 minutos usando 6X SSC de 5°C a 10°C por debajo de la T_m calculada.

[0035] Las secuencias de aminoácidos de polipéptidos variantes pueden diferir de la secuencia de aminoácidos de las partes maduras de cualquiera de las SEC ID n°: 4 o 6, por una inserción o delección de uno o más residuos de aminoácidos y/o la sustitución de uno o más residuos de aminoácidos por residuos de aminoácidos diferentes. Preferiblemente, cambios de aminoácidos son de una naturaleza menor, que es sustituciones de aminoácido conservadoras que significativamente no afectan al pliegue y/o actividad de la proteína; delecciones pequeñas, típicamente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; extensiones carboxilo o amino terminal pequeñas, como un residuo de metionina amino terminal; un pequeño péptido de enlace de hasta aproximadamente 20-25 residuos; o una pequeña extensión que facilita purificación cambiando la carga de red u otra función, como un tracto de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión.

[0036] Ejemplos de sustituciones conservadoras están dentro del 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). Por consiguiente, por ejemplo, la invención está relacionada con un polipéptido con, o comprendiendo, una secuencia como se expone en cualquiera de las SEC ID n°: 4 o 6, donde sustituciones de aminoácido conservadoras comprenden sustituciones, una a otra, entre los aminoácidos básicos (arginina, lisina y histidina), entre los aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), entre los aminoácidos polares (glutamina y asparagina), entre los aminoácidos hidrofóbicos (alanina, leucina, isoleucina y valina), entre los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), y entre los aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina), o cualquier combinación de estos, o fragmentos activos de los estos. Sustituciones de aminoácido que generalmente no alteran la actividad específica se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, por H. Neurath and R.L. Hill, 1979, en, *The Proteins*, Academic Press, Nueva York. Los intercambios 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 al igual que estos a la inversa.

[0037] Un polipéptido de la presente invención puede ser un polipéptido fúngico o bacteriano. El polipéptido fúngico se puede derivar de un hongo filamentoso o de una levadura.

[0038] En formas de realización particulares, el polipéptido de la invención es i) una proteasa bacteriana; ii) una proteasa del filo Actinobacteria; iii) de la clase Actinobacteria; iv) del orden actinomycetales; v) de la familia Nocardioseae; vi) del género *Nocardopsis*; y/o una proteasa derivado de vii) especie *Nocardopsis*, como *Nocardopsis alba*, *Nocardopsis alkatiphila*, *Nocardopsis antarctica*, *Nocardopsis prasina*, *Nocardopsis composta*, *Nocardopsis exhalans*, *Nocardopsis halophile*, *Nocardopsis halotolerans*, *Nocardopsis kunsanensis*, *Nocardopsis listeri*, *Nocardopsis lucentensis*, *Nocardopsis metallicus*, *Nocardopsis synnemataformans*, *Nocardopsis trehalosi*, *Nocardopsis tropica*, *Nocardopsis umidischolae*, *Nocardopsis xinjiangensis*, o *Nocardopsis dassonvillei*, por ejemplo, de bien *Nocardopsis dassonvillei* subesp. *dassonvillei* DSM 43235, *Nocardopsis prasina* DSM 15649, *Nocardopsis prasina* (previamente alba) DSM 14010, *Nocardopsis* sp. DSM 16424, *Nocardopsis alkaliphila* DSM 44657, o fde *Nocardopsis lucentensis* DSM 44048.

[0039] En una forma de realización particular, la proteasa deriva de *Nocardopsis alba*, *Nocardopsis alkaliphila*, *Nocardopsis dassonvillei*, *Nocardopsis lucentensis*, *Nocardopsis prasina*, o *Nocardopsis* sp.

[0040] La taxonomía anterior está según el capítulo: *The road map to the Manual by G.M. Garrity & J. G. Holt en Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2001, second edition, volume 1, David R. Bone, Richard W. Castenholz.*

[0041] Se entenderá que para las especies mencionadas, la invención incluye los estados imperfectos y perfectos y otros equivalentes taxonómicos, por ejemplo, anamorfos, independientemente del nombre de especies por las que se conocen. Expertos en la técnica fácilmente reconocen la identidad de equivalentes apropiados.

[0042] Cepas de estas especies son fácilmente accesibles al público en un número de colecciones de cultivo, como la American Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS) y Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

[0043] Además, tales polipéptidos se pueden identificar y obtener de otras fuentes incluyendo microorganismos aislados de naturaleza (p. ej., suelo, abonos, agua, etc.) usando las sondas mencionadas anteriormente. Técnicas para aislamiento de microorganismos de hábitats naturales se conocen en la técnica. La secuencia de ácidos nucleicos puede luego derivar por selección de forma similar de un genómico o genoteca de ADNc de otro microorganismo. Una vez que una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido ha sido detectada con la sonda(s), la secuencia puede aislarse o clonarse por utilización de técnicas que se conocen por aquellos de habilidad común en la técnica (ver, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, supra).

[0044] Tal y como se define aquí, un polipéptido "aislado" es un polipéptido que está esencialmente libre de otros polipéptidos de no proteasa, por ejemplo, al menos aproximadamente 20% puro, preferiblemente al menos

aproximadamente 40% puro, más preferiblemente aproximadamente 60% puro, incluso más preferiblemente aproximadamente 80% puro, de forma más preferida aproximadamente 90% puro, e incluso de forma más preferida aproximadamente 95% puro, como se determina por SDS-PAGE.

5 [0045] Polipéptidos codificados por secuencias de ácidos nucleicos de la presente invención también incluyen polipéptidos fundidos o polipéptidos de fusión divisibles en el que otro polipéptido se funde al N-terminal o C-terminal del polipéptido o fragmento de este. Un polipéptido fusionado se produce por fusión de una secuencia de ácido nucleico (o una parte de esta) codificando otro polipéptido para una secuencia de ácido nucleico (o una parte de esta) de la presente invención. Técnicas para producir polipéptidos de fusión se conocen en la técnica, e incluyen ligar las secuencias de codificación que codifican los polipéptidos, de modo que estas están en marco y que la expresión del polipéptido fusionado está bajo control del mismo promotor(es) y terminador.

15 [0046] En particular, los polipéptidos son ácido-estables. Para los presentes fines, el término ácido-estable significa que la actividad residual después de 2 horas de incubación a pH 2,0, pH 2,5 o pH 3,0 y 37°C, es al menos 50%, en comparación con la actividad residual de una muestra correspondiente incubada durante 2 horas a pH 9,0 y 5°C. En una forma de realización particular, la actividad residual es al menos 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, o al menos 90%. Un ensayo adecuado para determinar estabilidad de ácido es el ensayo de estabilidad de pH del ejemplo 2.

20 [0047] También, los polipéptidos son álcali-estables. Para los presentes fines, el término álcali-estable significa que la actividad residual después de 2 horas de incubación a pH 12,0 y 37°C, es al menos 85%, en comparación con la actividad residual de una muestra correspondiente incubada durante 2 horas a pH 9,0 y 5°C. En una forma de realización particular, la actividad residual es al menos 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, o al menos 92%. Un ensayo adecuado para determinar estabilidad de álcali es el ensayo de estabilidad de pH del ejemplo 4.

25 [0048] Además, los polipéptidos de la invención y para el uso de acuerdo con la invención tienen i) una actividad relativa a 15°C y pH 9 de al menos 0,08, 0,10, o al menos 0,11 ii) una actividad relativa a 25°C y pH 9 de al menos 0,10, 0,15, o al menos 0,17 y/o iii) una actividad relativa a 37°C y pH 9 de al menos 0,20, 0,25, o al menos 0,30. La prueba de perfil de temperatura del ejemplo 4 se usa para estas determinaciones.

30 [0049] Además, los polipéptidos tienen una T_m , como determinada por DSC, de al menos 76,6°C, o de al menos 77, 78, o al menos 78,2°C. T_m se determina a pH 7,0 como se describe en el ejemplo 7.

35 [0050] Adicionalmente, la proteasa de la invención puede mostrar una actividad específica en la hemoglobina a pH 7,5 y 25°C de al menos 38,4 AU/g. La actividad específica se puede determinar como se describe en el ejemplo 5. La proteasa puede mostrar una actividad específica de al menos 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 49,8, o al menos 50 AU/g.

40 [0051] Además, la proteasa, es capaz de mejorar, por lo menos 13% en comparación con el blanco, el nivel de proteína digerible de una dieta de comida de maíz/semilla de soja (SBM:Maíz = 2:3 (p/p)) en un modelo de digestión monogástrico *in vitro*. El modelo incluye un paso de digestión gástrica (1,0 hora a pH 3,0 y 40°C), y un paso de digestión intestinal posterior (4,5 horas a pH 6,8 y 40°C). El modelo también incluye adición de pepsina (3000 U/g, en el paso de digestión gástrica) y de pancreatina (8 mg/g, en el paso de digestión intestinal). La dosificación de proteasa es 100 mg de proteína de enzima proteasa (EP) por kg de dieta. Un modelo adecuado se describe en el ejemplo 8. El nivel de mejora puede ser al menos 14%, 15%, o al menos 16%.

50 [0052] La invención excluye la proteasa derivada de (i) *Nocardiosis dassonvillei* NRRL 18133 que se describe en WO 88/03947; (ii) *Nocardiosis sp.* cepa OPC-210 (FERM P-10508) que se describe en JP 2-255081-A; y/o (iii) la proteasa derivada de cepa ZIMET 43647 de la especie *Nocardiosis dassonvillei* que se describe en DD 200432|8.

Secuencias de ácidos nucleicos

55 [0053] La presente invención también se refiere a secuencias de ácidos nucleicos aisladas que codifican un polipéptido de la presente invención. Secuencias de ácidos nucleicos particulares de la invención son (i) nucleótidos 1-1149, 1-87, 88-573 y 574-1149 de la SEC ID n°: 3, y (ii) nucleótidos 1-1149, 1-87, 88-573 y 574-1149 de la SEC ID n°: 5, y (iii) cualquier combinación de estos.

60 [0054] Nucleótidos particularmente preferidos son nucleótidos 574-1149 de la SEC ID n°: 3 y (ii) nucleótidos 574-1149 de la SEC ID n°: 5, correspondientes a las partes o regiones de codificación de polipéptidos maduros.

65 [0055] La presente invención también incluye secuencias de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido con las partes maduras de las SEC ID n°: 4 o 6, que difieren de las partes correspondientes de las SEC ID n°: 3 o 5, respectivamente, a causa de la degeneración del código genético. La presente invención también se refiere a subsecuencias de cualquiera de las SEC ID n°: 3 o 5, que codifica fragmentos de las SEC ID n°: 4 o 6, y que tiene actividad de proteasa.

[0056] Una subsecuencia de cualquiera de las SEC ID n°: 3 o 5, es una secuencia de ácidos nucleicos incluida por las SEC ID n°: 3 o 5, excepto que uno o más nucleótidos del extremo 5' y/o 3' han sido eliminados. Preferiblemente, una subsecuencia contiene al menos 100, 125, 150, 175, 200, o al menos 225 nucleótidos, más preferiblemente al menos 300 nucleótidos, incluso más preferiblemente al menos 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, o al menos 560 nucleótidos.

[0057] La presente invención también se refiere a secuencias de nucleótidos que tienen un grado de identidad a las partes de codificación de péptidos maduros de cualquiera de las SEC ID n°: 3 o 5, de al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o al menos 99%.

[0058] Para determinar el grado de identidad de nucleótido, se utiliza el programa "align" al que se ha hecho referencia anteriormente.

[0059] La presente invención también se refiere a secuencias de ácidos nucleicos mutantes comprendiendo al menos una mutación en cualquiera de los nucleótidos catalogados arriba, preferiblemente las partes de codificación de péptidos maduras de estos, en las que la secuencia de ácidos nucleicos mutante codifica un polipéptido que (i) consiste en las secuencias de aminoácidos de cualquiera de las secuencias SEC ID n°: 4 o 6, preferiblemente las partes de péptido maduro de estas, o (ii) es un fragmento de cualquiera de las secuencias de (i).

[0060] Las técnicas usadas para aislar o clonar una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido se conocen en la técnica e incluyen aislamiento de ADN genómico, preparación de ADNc, o una combinación de estos. La clonación de las secuencias de ácidos nucleicos de la presente invención de tal ADN genómico puede ser efectuada, por ejemplo, usando la bien conocida reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o selección de anticuerpos de genotecas para detectar fragmentos de ADN clonados con características estructurales compartidas. Ver, por ejemplo, Innis et al., 1990, *PCR: A Guide to Methods and Application*, Academic Press, Nueva York. Otros procedimientos de amplificación de ácido nucleico como reacción en cadena de la ligasa (LCR), transcripción activada ligada (LAT) y amplificación a base de secuencia de ácido nucleico (NASBA) pueden utilizarse. La secuencia de ácidos nucleicos se puede clonar de una cepa de *Nocardiosis*, u otra u organismo relacionado y así, por ejemplo, puede ser una variante alélica o de especie de la región de codificación de polipéptido de la secuencia de ácidos nucleicos.

[0061] El término "secuencia de ácidos nucleicos aislada" como se utiliza en este caso se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que está esencialmente libre de otras secuencias de ácidos nucleicos, por ejemplo, al menos aproximadamente 20% puro, preferiblemente al menos aproximadamente 40% puro, más preferiblemente al menos aproximadamente 60% puro, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 80% puro, y de forma más preferida al menos aproximadamente 90% puro, como se determina por electroforesis de agarosa. Por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos aislada se puede obtener por procedimientos de clonación estándar usados en ingeniería genética para recolocar la secuencia de ácidos nucleicos de su ubicación natural a un sitio diferente donde este será reproducido. Los procedimientos de clonación pueden implicar escisión y aislamiento de un fragmento de ácido nucleico deseado comprendiendo la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido, inserción del fragmento en una molécula de vector, e incorporación del vector recombinante en una célula huésped donde copias múltiples o clones de la secuencia de ácidos nucleicos se replicarán. La secuencia de ácidos nucleicos puede ser de origen genómico, ADNc, ARN, semisintético, sintético, o cualquier combinación de estos.

[0062] Modificación de una secuencia de ácidos nucleicos 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 de forma de origen no natural o formas del polipéptido. Estos polipéptidos puede diferir en alguna manera creada genéticamente del polipéptido aislado de su fuente nativa, por ejemplo, variantes que difieren en la actividad específica, termoestabilidad, pH óptimo, alergenicidad, o similares. La secuencia variante puede construirse basándose en la secuencia de ácidos nucleicos presentada como la parte de codificación de polipéptido, o parte de codificación de péptido madura, de cualquiera de las SEC ID n°: 3 o 5, por ejemplo, una subsecuencia de esta, y/o por introducción de sustituciones de nucleótido que no dan lugar a otra secuencia de aminoácidos del polipéptido codificadas por la secuencia de ácidos nucleicos, pero que corresponden al uso de codón del organismo huésped destinado para la producción de la proteasa, 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, ver, por ejemplo, Ford et al., 1991, *Protein Expression and Purification 2: 95-107*. Polipéptidos hipoalergénicos pueden, por ejemplo, prepararse como se ha descrito anteriormente.

[0063] Será aparente a los expertos en la técnica que tales sustituciones pueden hacerse fuera de las regiones importantes a la función de la molécula y todavía suponer un polipéptido activo. Residuos de aminoácidos esenciales para la actividad del polipéptido codificados por la secuencia de ácidos nucleicos aislada de la invención y, por lo tanto, preferiblemente no sujetos a sustitución, se pueden identificar según procedimientos conocidos en la técnica, como mutagénesis dirigida o mutagénesis de escaneado de alanina (ver, por ejemplo, Cunningham and Wells, 1989, *Science 244: 1081-1085*). En esta técnica, mutaciones se introducen en cada residuo positivamente cargado en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se evalúan para actividad de proteasa para identificar residuos de aminoácidos que son importantes para la actividad de la molécula. Sitios de interacción de sustrato de

proteasa pueden también determinarse por análisis de la estructura tridimensional como determinado por tales técnicas como análisis de resonancia magnética nuclear, cristalografía o etiquetado de fotoafinidad (ver, por ejemplo, de Vos et al., 1992, *Science* 255: 306-312 ; Smith et al., 1992, *Journal of Molecular Biology* 224: 899-904 ; Wlodaver et al., 1992, *FEBS Letters* 309: 59-64).

5

Métodos para producir secuencias de ácidos nucleicos mutantes

[0064] La presente invención además se refiere a métodos para producir una secuencia de ácidos nucleicos mutante, comprendiendo introducción de al menos una mutación en las partes de codificación de polipéptidos maduros de cualquiera de las SEC ID n°: 3 o 5, o una subsecuencia de la misma, donde la secuencia de ácidos nucleicos mutante codifica un polipéptido que consiste de los péptidos maduros de las SEC ID n° 4 o 6 o un fragmento de estos que tiene actividad de proteasa.

10

[0065] La introducción de una mutación en la secuencia de ácidos nucleicos para intercambiar un nucleótido por otro nucleótido se puede realizar por mutagénesis dirigida que usa cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. Particularmente útil es el procedimiento que utiliza un vector de ADN bicatenario superenrollado con un inserto de interés y dos cebadores sintéticos con la mutación deseada. Los cebadores oligonucleótidos, cada complementario a hilos opuestos del vector, se extienden durante variación cíclica de la temperatura mediante Pfu ADN polimerasa. En la incorporación de los cebadores, un plásmido mutado con cortes en bisel se genera. Después del ciclo de temperatura, el producto se trata con DpnI que es específico para ADN hemimetilado y metilado para digerir el molde de ADN parental y para seleccionar para ADN sintetizado con mutación. Otros procedimientos conocidos en la técnica puede usarse también.

15

20

Construcciones de ácidos nucleicos

25

[0066] La presente invención también se refiere a construcciones de ácidos nucleicos comprendiendo una secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención unidos operativamente a una o más secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada bajo condiciones compatibles con las secuencias de control. Expresión se entenderá que incluye cualquier paso implicado en la producción del polipéptido incluyendo, pero no limitado a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.

30

[0067] "Construcción de ácido nucleico" se define aquí como una molécula de ácido nucleico, o bien bicatenaria o monocatenaria, que se aísla de un gen de origen natural o que ha sido modificado para contener segmentos de ácido nucleico combinados y superpuesto en cierto modo que de otra manera no existiría en la naturaleza. El término construcción de ácidos nucleicos es sinónimo con la expresión de término *cassette* cuando la construcción de ácidos nucleicos contiene todas las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia codificante de la presente invención. El término "secuencia codificante" se define aquí como una secuencia de ácidos nucleicos que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de su producto proteínico. Los límites de la secuencia codificante se determinan generalmente por un sitio de unión del ribosoma (procariotas) o por codón de inicio ATG (eucariotas) localizados justo arriba del marco de lectura abierto en el extremo 5' del ARNm y una secuencia del terminador de transcripción localizada justo abajo del marco de lectura abierto en el extremo 3' del ARNm. Una secuencia codificante puede incluir, pero no se limita a, ADN, ADNc y secuencias de ácidos nucleicos recombinantes.

35

40

[0068] Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica aislada un polipéptido de la presente invención se puede manipular en una variedad de vías para proveer a expresión del polipéptido. Manipulación de la secuencia de ácidos nucleicos antes de su inserción en un vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para modificar secuencias de ácidos nucleicos utilizando métodos de ADN recombinante se conocen bien en la técnica.

45

50

[0069] El término "secuencias de control" se define aquí para incluir todos componentes que son necesarios o ventajosos para la expresión de un polipéptido de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa o extranjera a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido. Tales secuencias de control incluyen, pero de forma no limitativa, una 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 traduccionales y transcripcionales. Las secuencias de control se pueden proporcionar con conectores con motivo de introducir sitios de restricción específicos facilitando ligamiento de las secuencias de control con la región de codificación de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido. El término "unido operativamente" se define aquí como una configuración en la que una secuencia de control se coloca apropiadamente en una posición relativa a la secuencia codificante de la secuencia de ADN, de manera que la secuencia de control dirige la expresión de un polipéptido.

55

60

[0070] La secuencia de control puede ser una secuencia del promotor apropiada, una secuencia de ácidos nucleicos que es reconocida por una célula huésped para la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos. La secuencia del promotor contiene secuencias de control transcripcionales que median la expresión del polipéptido. El promotor

65

puede ser cualquier secuencia de ácidos nucleicos que muestra actividad transcripcional en la célula huésped de elección, incluyendo mutante, truncado y promotores híbridos, y se pueden obtener de genes que codifican polipéptidos intracelulares o extracelulares bien homólogos o heterólogos a la célula huésped.

- 5 [0071] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de las construcciones de ácidos nucleicos de la presente invención, especialmente en una célula huésped bacteriana, son los promotores obtenidos de la *E. coli lac operon*, gen de agarasa de *Streptomyces coelicolor* (*dagA*), gen de levansucrasa de *Bacillus subtilis* (*sacB*), gen de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (*amyL*), gen de amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus* (*amyM*),
 10 gen de alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (*amyQ*), gen de penicilinasa de *Bacillus licheniformis* (*penP*), genes *xylA* y *xylB* de *Bacillus subtilis* y gen de beta lactamasa procariótica (cVilla-Kamaroff et al., 1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 3727-3731*), al igual que el promotor *tac* (DeBoer et al., 1983, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80: 21-25*). Además promotores se describen en "Useful proteins from recombinant bacteria" en *Scientific American*, 1980, 242: 74-94 ; y en Sambrook et al., 1989, supra.
- 15 [0072] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de las construcciones de ácidos nucleicos de la presente invención en una célula huésped filamentosa fúngica son promotores obtenidos de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, alfa-amilasa neutra *Aspergillus niger*, ácido estable de alfa amilasa 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* y proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), al
 20 igual que el promotor NA2-tpi (un híbrido de los promotores de los genes para alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*) y promotores mutantes, truncados e híbridos de estos.
- 25 [0073] En un huésped de levadura, promotores útiles se obtienen de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (*ENO 1*), galactocinasa de *Saccharomyces cerevisiae* (*GAL1*), alcohol dehidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (*ADH2/GAP*) y 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros promotores útiles para células huésped de levadura son descritos por Romanos et al., 1992, *Yeast* 8: 423-488.
- 30 [0074] La secuencia de control puede también ser una secuencia del terminador de transcripción adecuada, una secuencia reconocida por una célula huésped para terminar la transcripción. La secuencia del terminador se une operativamente al 3' terminal de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido. Cualquier terminador que es funcional en la célula huésped de elección se puede utilizar en la presente invención.
- 35 [0075] Terminadores preferidos para células huésped filamentosas fúngicas se obtienen 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*.
- 40 [0076] Terminadores preferidos para células huésped de levadura se obtienen de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, citocromo de *Saccharomyces cerevisiae* C (*CYC1*) y gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros terminadores útiles para células huésped de levadura se describen por Romanos et al., 1992, supra.
- 45 [0077] Terminadores preferidos para células huésped bacterianas, como una célula huésped de *Bacillus*, son los terminadores de gen de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (*amyL*), el gen de amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus* (*amyM*), o el gen de alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (*amyQ*).
- 50 [0078] La secuencia de control puede también ser una secuencia líder adecuada, una región no traducida de un ARNm que es importante para traducción por la célula huésped. La secuencia líder se une operativamente al 5' terminal de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido. Cualquier secuencia líder que es funcional en la célula huésped de elección se puede utilizar en la presente invención.
- 55 [0079] Líderes preferidos para células huésped filamentosas fúngicas se obtienen de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.
- 60 [0080] Líderes adecuados para células huésped de levadura se obtienen de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (*ENO 1*), 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae*, y alcohol dehidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (*ADH2/GAP*).
- 65 [0081] La secuencia de control puede también ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia operativamente unida al 3' terminal de la secuencia de ácidos nucleicos y que, cuando se transcribe, es reconocida por la célula huésped como una señal para añadir residuos de poliadenosina para ARNm transcrito. Cualquier secuencia de poliadenilación que es funcional en la célula huésped de elección se puede utilizar en la presente invención.

[0082] Secuencias de poliadenilación preferidas para células huésped filamentosas fúngicas se obtienen de los genes para 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*.

5 [0083] Secuencias de poliadenilación útiles para células huésped de levadura se describen por Guo and Sherman, 1995, *Molecular Cellular Biology* 15: 5983-5990.

[0084] La secuencia de control puede también ser una región de codificación de péptido señal que codifica para una secuencia de aminoácidos única al amino terminal de un polipéptido y dirige el polipéptido codificado en la vía secretora de la célula. El extremo 5' de la secuencia codificante de la secuencia de ácidos nucleicos puede intrínsecamente contener una región de codificación de péptido de señal naturalmente única en el marco de lectura de traducción con el segmento de la región de codificación que codifica el polipéptido secretado. Alternativamente, el extremo 5' de la secuencia codificante puede contener una región de codificación de péptido de señal que es extranjero a la secuencia codificante. La región de codificación del péptido de señal foráneo puede requerirse donde la secuencia codificante naturalmente no contiene una región de codificación de péptido de señal. Alternativamente, la región de codificación de péptido de señal foráneo puede simplemente reemplazar la región de codificación del péptido señal natural para mejorar secreción del polipéptido. No obstante, cualquier región de codificación del péptido de señal que dirige el polipéptido expresado en la vía secretora de una célula huésped de elección se puede utilizar en la presente invención.

[0085] Regiones de codificación de péptido de señal eficaces para células huésped bacterianas son las regiones de codificación de péptido de señal obtenidas de los genes para amilasa maltogénica de *Bacillus* NCIB 11837, alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, subtilisina de *Bacillus licheniformis*, alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis*, proteasas neutras de *Bacillus stearothermophilus* (nprT, nprS, nprM) y *Bacillus subtilis* prsA. Además péptidos de señal se describen por Simonen and Palva, 1993, *Microbiological Reviews* 57: 109-137.

[0086] Regiones de codificación de péptido de señal eficaces para células huésped filamentosas fúngicas son las regiones de codificación de péptido de señal obtenidas de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, amilasa neutra de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, celulasa de *Humicola insolens* y lipasa *Humicola lanuginosa*.

[0087] Péptidos de señal útiles para células huésped de levadura se obtienen de los genes para factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otras regiones de codificación de péptido de señal útiles se describen por Romanos et al., 1992, supra.

[0088] La secuencia de control puede también ser una región de codificación de propéptido que codifica para 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 propolipéptido es generalmente inactivo y se puede convertir a un polipéptido maduro activo por escisión autocatalítica o catalítica del propéptido del propolipéptido. La región de codificación de propéptido se puede obtener de los genes para proteasa alcalina de *Bacillus subtilis* (aprE), proteasa neutra de *Bacillus subtilis* (nprT), alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei* y lacasa de *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836).

[0089] Preferiblemente, la región de codificación de péptido de señal es la región de codificación del péptido de señal de las SEC ID n°: 1, 3, 5, 7, 9 u 11.

[0090] También preferiblemente, la región de codificación de propéptido es las regiones de codificación de propéptido de cualquiera de las SEC ID n°: 1, 3, 5, 7, 9 u 11.

[0091] Donde ambos péptido de señal y regiones de propéptido están presentes en el amino terminal de un polipéptido, la región de propéptido está situada junto al amino terminal de un polipéptido y la región de péptido señal está situada junto al amino terminal de la región de propéptido.

[0092] Puede también ser deseable para añadir secuencias reguladoras que permiten la regulación de la expresión del polipéptido relativas al crecimiento de la célula huésped. Ejemplos de sistemas reguladores son los que causan que la expresión del gen se gire ON u OFF en respuesta a un estímulo físico o químico, incluyendo la presencia de un compuesto regulador. Sistemas reguladores en sistemas procariontas incluyen los sistemas operadores lac, tac y trp. En la levadura, el sistema ADH2 o sistema GAL1 puede utilizarse. En hongos filamentosos, el promotor de TAKA alfa-amilasa, promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae* se pueden utilizar como secuencias reguladoras. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son las que permiten amplificación génica. En sistemas eucariotas, estas incluyen el gen de dihidrofolato-reductasa que se amplifica en presencia de metotrexato y los genes de metalotioneína que se amplifican con metales pesados. En estos casos, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido se uniría operativamente con la secuencia reguladora.

65 **Vectores de expresión**

[0093] La presente invención también se refiere a vectores de expresión recombinantes comprendiendo una secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención, un promotor y señales de parada traduccionales y transcripcionales. Las varias secuencias de ácidos nucleicos y de control descritas anteriormente pueden juntarse para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más sitios de restricción convenientes para permitir inserción o sustitución de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido en tales sitios. Alternativamente, la secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención se puede expresar por inserción de la secuencia de ácidos nucleicos o una construcción 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 se une operativamente con las secuencias de control apropiadas para la expresión.

[0094] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (p. ej., un plásmido o virus) que puede ser convenientemente sometido a procedimientos de ADN recombinante y puede provocar la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos. La elección del vector típicamente dependerá de la compatibilidad del vector con la célula huésped en la que el vector debe ser introducido. Los vectores puede ser plásmidos lineales o circulares cerrados.

[0095] 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 replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma, o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula huésped, se integra en el genoma y se replica con la cromosoma(es) en los que ha sido integrado. Además, un único vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ADN total para ser introducido en el genoma de la célula huésped, o un transposón pueden utilizarse.

[0096] Los vectores de la presente invención preferiblemente contienen uno o más marcadores seleccionables que permiten selección fácil de células transformadas. Una etiqueta seleccionable es un gen, el producto del cual proporciona resistencia vírica o biocida, resistencia a metales pesados, prototrofia para auxótrofos y similares. Ejemplos de marcadores seleccionables bacterianos son los genes de *Bacillus subtilis* o *Bacillus licheniformis*, o marcadores que confieren resistencia antibiótica, como ampicilina, canamicina, cloranfenicol o resistencia a tetraciclina. Marcadores adecuados para células huésped de levadura son ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 y URA3. Marcadores seleccionables para uso en una célula huésped filamentosa fúngica incluyen, pero de forma no limitativa, amdS (acetamidasa), argB (omitina carbamoiltransferasa), bar (fosfonitricina acetiltransferasa), hygB (higromicina fosfotransferasa), niaD (nitrato-reductasa), pyrG (orotidina-5'-fosfato-descarboxilasa), sC (adeniltransferasa de sulfato), trpC (sintasa de antranilato), al igual que equivalentes de estos. Preferido para uso en una célula de *Aspergillus* son los genes amdS y pyrG de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y el gen bar de *Streptomyces higroscopicus*.

[0097] Los vectores de la presente invención preferiblemente contienen un elemento(s) que permite integración estable del vector en el genoma huésped de la célula o replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.

[0098] Para integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede depender de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido o cualquier otro elemento del vector para integración estable del vector en el genoma por recombinación homóloga o no homóloga. Alternativamente, el vector puede contener secuencias de ácidos nucleicos adicionales para dirigir integración por recombinación homóloga en el genoma de la célula huésped. Las secuencias de ácidos nucleicos adicionales permiten al vector ser integrado en el genoma de la célula huésped en una ubicación(es) precisa en el cromosoma(s). Para aumentar la probabilidad de integración en una ubicación precisa, los elementos integracionales deberían preferiblemente contener un número suficiente de ácidos nucleicos, como de 100 a 1500 pares de bases, preferiblemente de 400 a 1500 pares de bases, y de forma más preferida de 800 a 1500 pares de bases, que son altamente homólogos a la secuencia objetivo correspondiente para mejorar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos integracionales pueden ser cualquier secuencia que es homóloga a la secuencia objetivo en el genoma de la célula huésped. Además, los elementos integracionales pueden ser secuencias de ácidos nucleicos codificantes o no codificantes. Por otro lado, el vector se puede integrar en el genoma de la célula huésped por recombinación no homóloga.

[0099] Para replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación permitiendo al vector replicar de manera autónoma en la célula huésped en cuestión. Ejemplos de orígenes bacterianos de replicación son los orígenes de replicación de plásmidos pBR322, pUC19, pACYC177 y pACYC184 permitiendo replicación en *E. coli*, y pUB110, pE194; pTA1060 y pAMR1 permitiendo replicación en *Bacillus*. Ejemplos de orígenes de replicación para uso en una célula huésped de levadura son el origen de micra de replicación 2, ARS1, ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3 y la combinación de ARS4 y CEN6. El origen de replicación puede ser uno con una mutación que hace su funcionamiento termosensible en la célula huésped (ver, por ejemplo, Ehrlich, 1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 75: 1433).

[0100] Más de una copia de una secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención se puede insertar en la célula huésped para aumentar producción del producto genético. Un aumento en el número de copia de la secuencia

de ácidos nucleicos se puede obtener por integración de al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped o incluyendo un gen marcador seleccionable amplificable con la secuencia de ácidos nucleicos donde células con copias amplificadas del gen marcador seleccionable, y así copias adicionales de la secuencia de ácidos nucleicos, se pueden seleccionar para cultivo de las células en presencia del agente apropiado seleccionable.

5 [0101] Los procedimientos usados para unir los elementos anteriormente descritos para construcción de los vectores de expresión recombinantes de la presente invención se conocen por un experto en la técnica (ver, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, supra).

10 [0102] La proteasa puede también ser coexpresada junto con al menos otra enzima de interés para alimento para animales, como una amilasa, fitasa, xilanasas, galactanasas, alfa-galactosidasas, proteasa, fosfolipasa, y/o una beta-glucanasa.

15 [0103] Las enzimas se pueden coexpresar de distintos vectores, de un vector, o usando una mezcla de ambas técnicas. Cuando se usan vectores diferentes, los vectores pueden tener marcadores seleccionables diferentes y orígenes de replicación diferentes. Cuando se usa solo un vector, los genes se pueden expresar de uno o más promotores. Si se clona bajo la regulación de un promotor (di- o multicistrónico), la orden en la que los genes se clonan puede afectar a los niveles de expresión de las proteínas. La proteasa puede también expresarse como una proteína de fusión, es decir, que la proteasa de gen que codifica se ha fundido en marco al gen que codifica otra proteína. Esta proteína puede ser otra enzima o un dominio funcional de otra enzima.

Células huésped

25 [0104] La presente invención también se refiere a células huésped recombinantes, comprendiendo una secuencia de ácidos nucleicos de la invención, que se usan ventajosamente en la producción recombinante de los polipéptidos. Un vector comprendiendo una secuencia de ácidos nucleicos 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 extracromosómico autorreplicante como se describe anteriormente. El término "célula huésped" encierra cualquier progenie de una célula madre que no es idéntica a la célula madre debido a mutaciones que ocurren durante replicación. La elección de una célula huésped en gran parte depende del gen que codifica el polipéptido y su fuente.

30 [0105] La célula huésped puede ser un microorganismo unicelular, por ejemplo, un procarionta, o un microorganismo no unicelular, por ejemplo, un eucariota.

35 [0106] Células unicelulares útiles son células bacterianas como bacterias gram positivas incluyendo, pero no limitado a, una célula de *Bacillus*, o una célula de *Streptomyces*, o células de bacterias del ácido láctico; o bacterias gram negativas, como *E. coli* y *Pseudomonas* sp. Bacterias del ácido láctico incluyen, pero de forma no limitativa, especies de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus* y *Enterococcus*.

40 [0107] La introducción de un vector en una célula huésped bacteriana puede, por ejemplo, efectuarse por transformación de protoplasto (ver, por ejemplo, Chang y Cohen, 1979, *Molecular General Genetics* 168: 111-115), usando células competentes (ver, por ejemplo, Young y Spizizin, 1961, *Journal of Bacteriology* 81: 823-829, o Dubnau y Davidoff-Abelson, 1971, *Journal of Molecular Biology* 56: 209-221), electroporación (ver, por ejemplo, Shigekawa y Dower, 1988, *Biotechniques* 6: 742-751), o conjugación (ver, por ejemplo, Koehler y Thorne, 1987, *Journal of Bacteriology* 169: 5771-5278).

[0108] La célula huésped puede ser una eucariota, como una célula animal no humana, una célula de insecto, una célula vegetal o una célula fúngica.

50 [0109] En una forma de realización particular, la célula huésped es una célula fúngica. "Hongos" como se utiliza en este caso incluye el filo *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* y *Zygomycota* (como definido por Hawksworth et al., en *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 Hawksworth et al., 1995, supra, page 171) y todos los hongos mitospóricos (Hawksworth et al., 1995, supra).

55 [0110] En otra forma de realización particular, la célula huésped fúngica es una célula de levadura. "Levadura", como se usa aquí, incluye levadura de ascosporogenous (Endomycetales), levadura de basidiosporogenous y levadura de *Fungi Imperfecti* (Blastomycetes). Ya que la clasificación de levadura puede cambiar en el futuro, para los fines de esta invención, levadura debe definirse como descrita en *Biology and Activities of Yeast* (Skinner, F.A., Passmore, S.M., y Davenport, R.R., eds, *Soc. App. Bacteriol. Symposium Series No. 9, 1980*).

[0111] La célula huésped de levadura puede ser una célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o *Yarrowia*.

65 [0112] La célula huésped fúngica puede ser una célula micótica filamentosa. "Hongos filamentosos" incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión *Eumycota* y *Oomycota* (como definido por Hawksworth et al., 1995, supra).

Los hongos filamentosos se caracterizan por el hecho de que tienen una pared micelial compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano y otros polisacáridos complejos. Crecimiento vegetativo es por alargamiento hifal y catabolismo de carbono es estrictamente aeróbico. En cambio, crecimiento vegetativo por levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* es por injerto de un talo unicelular y catabolismo de carbono puede ser fermentativo.

[0113] Ejemplos de células huésped filamentosas fúngicas son células de especies de, pero no limitado a, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Thielavia*, *Tolyposcladium*, o *Trichoderma*.

[0114] Células fúngicas se pueden transformar por un proceso implicando formación de protoplasto, transformación de los protoplastos y regeneración de la pared celular en una manera conocida *per se*. Procedimientos adecuados para transformación de células de *Aspergillus* huésped se describen en EP 238 023 y Yelton et al., 1984, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81: 1470-1474*. Métodos adecuados para transformación de especies de *Fusarium* se describen por Malardier et al., 1989, *Gene 78: 147-156* y WO 96/00787. Levadura puede transformarse usando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, en *Abelson, J.N. y Simon, M.L., editors, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Volume 194, pp 182-187*, Academic Press, Inc., New York; Ito et al., 1983, *Journal of Bacteriology 153: 163*; y Hinnen et al., 1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 1920*.

Métodos de producción

[0115] La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención comprendiendo (a) cultivo de una cepa, que en su forma de tipo salvaje es capaz de producir el polipéptido, para producir un sobrenadante comprendiendo el polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido. En una forma de realización preferida, la cepa es de filo *Actinobacteria*, preferiblemente de la clase *Actinobacteria*, más preferiblemente del orden *Actinomycetales*, incluso más preferiblemente de la familia *Nocardioseae*, y de forma más preferida del género *Nocardopsis*, por ejemplo, cualquiera de la especie *Nocardopsis*, como las cepas específicas catalogadas precedentes.

[0116] La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención comprendiendo (a) cultivo de una célula huésped bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación el polipéptido.

[0117] La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención comprendiendo (a) cultivo de una célula huésped bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido, donde la célula huésped comprende una secuencia de ácidos nucleicos mutante comprendiendo al menos una mutación en las partes de codificación de péptidos maduros de cualquiera de las SEC ID n°: 3 o 5, en la que la secuencia de ácidos nucleicos mutante codifica un polipéptido que (i) consiste en los péptidos maduros de cualquiera de las SEC ID n°: 4 o 6, respectivamente; o (ii) es una variante alélica de cualquiera de las secuencias de (i), donde la variante comprende una sustitución, eliminación o inserción de uno o más aminoácidos, o (iii) es una variante alélica de cualquiera de las secuencias de (i), o (iv) es un fragmento de cualquiera de las secuencias de (i).

[0118] En los métodos de producción de la presente invención, las células se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción de un polipéptido usando los métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula se puede cultivar por cultivo en matraz de agitación, fermentación a gran escala o a escala pequeña (incluyendo fermentaciones de estado sólido continua, por lotes o por alimentación por lotes) en el laboratorio o fermentadores industriales realizados en un medio adecuado y bajo condiciones que permiten al polipéptido expresarse y/o aislarse. El cultivo se desarrolla en un medio nutritivo adecuado comprendiendo fuentes de nitrógeno y carbono y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según composiciones publicadas (p. ej., en catálogos de la American Type Culture Collection). Si el polipéptido se secreta en el medio nutritivo, el polipéptido se puede recuperar directamente del medio. Si el polipéptido no se secreta, este se puede recuperar de lisados celulares.

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

[0120] El polipéptido resultante se puede recuperar por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido puede recuperarse del medio nutritivo por procedimientos convencionales incluyendo, pero no limitado a, centrifugado, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación, o precipitación.

[0121] Los polipéptidos de la presente invención se pueden purificar por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero no limitado a, cromatografía (p. ej., intercambio iónico, afinidad, hidrofóbica, cromatoenfoco y exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (p. ej., isoelectroenfoco preparativo),

solubilidad diferencial (p. ej., precipitación con sulfato amónico), SDS-PAGE, o extracción (ver, por ejemplo, *Protein Purification*, J.-C. Janson and Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989).

Plantas

5 [0122] La presente invención también se refiere a una planta transgénica, parte de planta, o célula vegetal que ha sido transformada con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con actividad de proteasa 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 recombinate se puede utilizar como tal para mejorar la calidad de un alimento o alimento, por ejemplo, mejora de valor nutritivo, palatabilidad y propiedades reológicas, o para destruir un factor antinutritivo.

10 [0123] En una forma de realización particular, el polipéptido se provee a las vacuolas de almacenamiento de endospermo en semillas. Este se puede obtener por sintetización de este como un precursor con un péptido señal adecuado, ver Horvath et al en *PNAS*, Feb. 15, 2000, vol. 97, no. 4, p. 1914-1919.

15 [0124] La planta transgénica puede ser *dicotyledonous* (una dicotiledónea) o *monocotyledonous* (una monocotiledónea) o variantes creadas genéticamente de estas. Ejemplos de plantas monocotiledóneas son hierbas, como césped de pradera (pasto azul, *Poa*), gramínea forrajera como *Festuca*, *Lolium*, césped templado, como *Agrostis*, y cereales, por ejemplo, trigo, avena, centeno, cebada, arroz, sorgo, triticale (híbrido de estabilizado trigo (*Triticum*) y centeno (*Secale*) y maíz (com). Ejemplos de planta dicotiledónea son tabaco, leguminosas, como girasol (*Helianthus*), algodón (*Gossypium*), altramuces, patata, remolacha azucarera, guisante, judía y semilla de soja y plantas crucíferas (familia *Brassicaceae*), como coliflor, semilla de colza y el organismo de modelo estrechamente relacionado *Arabidopsis thaliana*. Plantas de bajo fitato como se describe, por ejemplo, en la patente US n°. 5,689,054 y patente US n°. 6,111,168 son ejemplos de plantas creadas genéticamente.

20 [0125] Ejemplos de partes de planta son vástago, callo, hojas, raíz, frutas, semillas y tubérculos, al igual que los tejidos individuales comprendiendo estas partes, por ejemplo, epidermis, mesófilo, parénquima, tejidos vasculares, meristemas. También compartimentos de célula vegetal específicos, como cloroplasto, apoplasto, mitocondria, vacuola, peroxisomas y citoplasma se consideran que son una parte de planta. Además, cualquier célula vegetal, cualquiera que sea el origen del tejido, se considera que es una parte de planta. Asimismo, partes de planta como tejidos específicos y células aisladas para facilitar la utilización de la invención son también consideradas partes de planta, por ejemplo, embriones, endospermas, aleurona y revestimientos de semilla.

25 [0126] También incluido dentro del campo de la presente invención están la progenie de tales plantas, partes de planta y células vegetales.

30 [0127] La planta transgénica o célula vegetal que expresa un polipéptido de la presente invención se pueden construir conforme a métodos conocidos en la técnica. Brevemente, la planta o célula vegetal se construye por incorporación de una o más construcciones de expresión que codifican un polipéptido de la presente invención en el genoma huésped de la planta y propagando la planta modificada resultante o célula vegetal en una planta transgénica o célula vegetal.

35 [0128] Convenientemente, la construcción de expresión es una construcción de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido de la presente invención operativamente unido con secuencias reguladoras apropiadas requeridas para expresión de la secuencia de ácidos nucleicos en la planta o parte de planta de elección. Además, la construcción de expresión puede comprender una etiqueta seleccionable útil para identificación de células huésped en la que la construcción de expresión ha sido integrada y secuencias de ADN necesarias para introducción de la construcción en la planta en cuestión (esto depende del método de introducción de ADN que se usa).

40 [0129] La elección de secuencias reguladoras, como secuencias promotoras y terminadoras y opcionalmente secuencias de señal o de tránsito se determinan, por ejemplo, basándose en cuándo, dónde y cómo el polipéptido se desea que se exprese. Por ejemplo, la expresión del gen que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser constitutiva o inducible, o puede ser desarrollable, fase o tejido específico y el producto genético puede estar dirigido a un compartimento de célula específico, tejido o parte de planta como semillas u hojas. Secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, por Tague et al., 1988, *Plant Physiology* 86: 506.

45 [0130] Para expresión constitutiva, los siguientes promotores pueden ser utilizados: el promotor 35S-CaMV (Franck et al., 1980, *Cell* 21: 285-294), la ubiquitina de maíz 1 (Christensen AH, Sharrock RA and Quail 1992. *GMaize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation*), o el promotor de actina de arroz 1 (*Plant Mo. Biol.* 18, 675-689; Zhang W, McElroy D. and Wu R 1991, *Analysis of rice Act1 5' region activity in transgenic rice plants. Plant Cell* 3, 1155-1165). Promotores específicos a un órgano pueden ser, por ejemplo, un promotor de tejidos sumidero de almacenamiento como semillas, tubérculos de patata y frutas (Edwards & Coruzzi, 1990, *Ann. Rev. Genet.* 24: 275-303), o de tejidos sumidero metabólicos 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 de cuerpo de aceite de semilla (Chen et al., 1998, *Plant and Cell Physiology* 39: 935-941), el promotor de la proteína de almacenamiento napA de *Brassica napus*, o cualquier otro promotor específico de semilla conocido en la técnica, por ejemplo, como se describe en WO 91/14772. Además, el promotor puede ser un promotor específico de hoja como el promotor de rbcS de arroz o tomate (Kyojuka et al., 1993, *Plant Physiology* 102: 991-1000), el promotor de gen de metiltransferasa de adenina de virus de *Chlorella* (Mitra and Higgins, 1994, *Plant Molecular Biology* 26: 85-93), o el promotor aldP de gen 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 ser inducible por tratamientos abióticos como temperatura, sequía o alteraciones en la salinidad o inducibles por sustancias aplicadas exógenamente que activan el promotor, por ejemplo, etanol, estrógenos, hormonas de planta como etileno, ácido abscísico, ácido giberélico y/o metales pesados.

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

[0132] Aún más, el uso de codón se puede optimizar para las especies de planta en cuestión para mejorar expresión (ver Horvath et al referido anteriormente).

[0133] El gen marcador seleccionable y cualquier otra parte de la construcción de expresión se pueden elegir de aquellas disponibles en la técnica.

[0134] La construcción de ácidos nucleicos se incorpora en el genoma de la planta según técnicas convencionales conocidas en la técnica, incluyendo transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación mediada por virus, microinyección, bombardeo de partículas, transformación biolística y electroporación (Gasser et al., 1990, *Science* 244: 1293; Potrykus, 1990, *Bio/Technology* 8: 535; Shimamoto et al., 1989, *Nature* 338: 274).

[0135] Actualmente, transferencia de gen mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es el método de elección para generar dicotiledóneas transgénicas (para una revisión, ver Hooykas and Schilperoort, 1992, *Plant Molecular Biology* 19: 15-38), y esto puede también usarse para transformación de monocotiledóneas, aunque otros métodos de transformación son más frecuentemente usados para estas plantas. Actualmente, el método de elección para generar monocotiledóneas transgénicas, complementando el método de *Agrobacterium*, es bombardeo de partícula (oro microscópico o partículas de tungsteno revestido con la transformación ADN) de callos embrionarios o embriones de revelando (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 transformación de monocotiledóneas se basa en transformación de protoplasto como se describe por Omirulleh et al., 1993, *Plant Molecular Biology* 21: 415-428.

[0136] Después de la transformación, los transformantes que se han incorporado aquí, la construcción de expresión se selecciona y se regenera 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 regeneración o en las siguientes generaciones usando, por ejemplo, co-transformación con dos construcciones de T-ADN separadas o escisión específica de sitio del gen de selección por una recombinasa específica.

[0137] La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención comprendiendo (a) cultivo de una planta transgénica o una célula vegetal comprendiendo una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con actividad de proteasa de la presente invención bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.

Animales

[0138] La presente invención también se refiere a un animal transgénico no humano y productos o elementos de este, ejemplos de este son líquidos biológicos como leche y sangre, órganos, carne y células animales. Técnicas para expresión de proteínas, por ejemplo, en células mamíferas, se conocen en la técnica, ver, por ejemplo, *Handbook Protein Expression: A Practical Approach*, Higgins and Hames (eds), Oxford University Press (1999), y los otros tres manuales en esta serie acerca transcripción de gen, maduración del RNA y procesamiento postraduccional. En términos generales, para preparar un animal transgénico, células seleccionadas de un animal seleccionado se transforman con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con actividad de proteasa de la presente invención para expresar y producir el polipéptido. El polipéptido puede recuperarse del animal, por ejemplo, de la leche de animales hembra, o el polipéptido se puede expresar al beneficio del animal mismo, por ejemplo, para ayudar la digestión del animal. Ejemplos de animales se mencionan más adelante en la sección titulada Alimento para animales.

[0139] Para producir un animal transgénico con el propósito de recuperar proteasa de la leche del animal, un gen que codifica la proteasa se puede insertar en los huevos fertilizados de un animal en cuestión, por ejemplo, usando un vector de expresión de transgen que comprende un promotor de proteína de la leche adecuado y la proteasa de gen de codificación. El vector de expresión de transgen se microinyecta en huevos fertilizados y preferiblemente se integra permanentemente en el cromosoma. Un vez el huevo empieza a crecer y dividirse, el embrión potencial se implanta en una madre portadora y animales que llevan el transgen se identifican. El animal resultante puede después ser multiplicado por cultivo convencional. El polipéptido se puede purificar de la leche del animal, ver, por ejemplo, Meade, H.M. et al (1999): *Expression of recombinant proteins in the milk of transgenic animals, Gene expression systems: Using nature for the art of expression*. J. M. Fernandez and J. P. Hoeffler (eds.), Academic Press.

[0140] En la alternativa, para producir un animal transgénico no humano que lleva en el genoma de sus células somáticas y/o germinales una secuencia de ácidos nucleicos que incluye una construcción de transgen heterólogo que incluye una proteasa de codificación de transgen, el transgen puede unirse operativamente a una primera secuencia reguladora para expresión específica de glándula salival de proteasa, como descrito en WO 2000064247.

Composiciones

[0141] En todavía otro aspecto, la presente invención se refiere a composiciones comprendiendo un polipéptido de la presente invención.

[0142] 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 un granulado o un microgranulado. El polipéptido para ser incluido en la composición se puede estabilizar conforme a métodos conocidos en la técnica.

[0143] Ejemplos se dan más adelante de usos preferidos de los polipéptidos o composiciones de polipéptido de la invención.

Alimento para animales

[0144] La presente invención se dirige también a métodos para uso de los polipéptidos con actividad de proteasa en el alimento para animales, al igual que para composiciones alimenticias y aditivos alimenticios comprendiendo los polipéptidos de la invención.

[0145] El término animal incluye todos los animales, incluyendo seres humanos. Ejemplos de animales son no rumiantes y rumiantes. Animales rumiantes incluyen, por ejemplo, animales como oveja, cabras, caballos y ganado bovino, por ejemplo, ganado bovino para carne, vacas y terneros jóvenes. En una forma de realización particular, el animal es un animal no rumiante. Animales no rumiantes incluyen animales monogástricos, por ejemplo, cerdos o puercos (incluyendo, pero no limitado a, lechones, cerdos en crecimiento y cerdas); aves como pavos, patos y pollos (incluyendo, pero no limitado a, pollos para asar, estratos); terneros jóvenes; y peces (incluyendo, pero no limitado a, salmón, trucha, tilapia, bagre y carpas; y crustáceos (incluyendo, pero no limitado, a gambas y cigalas).

[0146] El término alimento o composición alimenticia significa cualquier compuesto, preparaciones, mezcla, o composición adecuada para, o destinado para, toma por un animal.

[0147] En el uso según la invención la proteasa se puede suministrar al animal antes, después, o simultáneamente con la dieta. Lo último se prefiere.

[0148] En una forma de realización particular, la proteasa, en la forma en la que se añade al alimento, o cuando se incluye en un aditivo de alimento, está bien definido. Bien definido significa que la preparación de proteasa es al menos 50% puro como determinado por cromatografía de exclusión de tamaño (véase ejemplo 12 de la WO 01/58275). En otras formas de realización particulares, la preparación de proteasa es al menos 60, 70, 80, 85, 88, 90, 92, 94, o al menos 95% puro como determinado por este método.

[0149] Una preparación bien definida de proteasa es ventajosa. Por ejemplo, es mucho más fácil a dosis correctamente al alimentar una proteasa que es esencialmente libre de interferir o contaminar otras proteasas. El término dosis correctamente se refiere en particular al objetivo de obtener resultados constantes y consistentes, y a la capacidad de optimización de dosificación basada en el efecto deseado.

[0150] Para uso en el alimento para animales, no obstante, la proteasa no necesita ser tan pura; esta puede, por ejemplo, incluir otras enzimas, en cuyo caso esto podría denominarse una preparación de proteasa.

[0151] La preparación de proteasa puede ser (a) añadida directamente al alimento (o usada directamente en un proceso de tratamiento de proteína), o (b) esta se puede usar en la producción de una o más composiciones

intermedias como aditivos alimenticios o premezclas que se añaden posteriormente al alimento (o se usan en un proceso de tratamiento). El grado de pureza anteriormente descrito se refiere a la pureza de la preparación de proteasa original, si se usa según (a) o (b) de arriba.

5 [0152] Preparaciones de proteasa con purezas de este orden de magnitud son en particular obtenibles usando métodos recombinantes de producción, mientras que no son así fácilmente obtenidas y también están sujetas a una variación entre lotes mucho más alta cuando la proteasa se produce por métodos de fermentación tradicionales.

[0153] Tal preparación de proteasa puede, por supuesto ser mezclada con otras enzimas.

10 [0154] En otra forma de realización particular, la proteasa para uso según la invención es capaz de solubilización de proteínas según el modelo *in vitro* del ejemplo 8 de este documento.

15 [0155] La proteína puede ser una proteína animal, como harina de carne y huesos, y/o harina de pescado; o esta puede ser una proteína vegetal.

[0156] El término proteínas vegetales como se utiliza en este caso se refiere a cualquier compuesto, composición, preparación o mezcla que incluye al menos una proteína derivada de u originada de un vegetal, incluyendo proteínas modificadas y derivados de proteína. En formas de realización particulares, el contenido de proteína de las proteínas vegetales es al menos 10, 20, 30, 40, 50, o 60% (p/p).

[0157] Proteínas vegetales pueden derivar de fuentes de proteína vegetal, como legumbres y cereales, por ejemplo, materiales de plantas de las familias *Fabaceae* (*Leguminosae*), *Cruciferaeae*, *Chenopodiaceae* y *Poaceae*, como harina de soja, harina de lupino y comida de semilla de colza.

25 [0158] En una forma de realización particular, la fuente de proteína vegetal es material de una o más plantas de la familia *Fabaceae*, por ejemplo, semilla de soja, altramuz, guisante, o judía.

[0159] En otra forma de realización particular, la fuente de proteína vegetal es material de una o más plantas de la familia *Chenopodiaceae*, por ejemplo, remolacha, remolacha azucarera, espinaca o quinua.

[0160] Otros ejemplos de fuentes de proteína vegetal son semilla de colza, semilla de girasol, semilla de algodón y repollo.

35 [0161] Semilla de soja es una fuente de proteína vegetal preferida.

[0162] Otros ejemplos de fuentes de proteína vegetal son cereales como cebada, trigo, centeno, avena, maíz (grano), arroz, triticale y sorgo.

40 [0163] El tratamiento según la invención de proteínas con al menos una proteasa de la invención produce una solubilización aumentada de proteínas, en comparación con la blanco. Al menos 101%, o 102%, 103%, 104%, 105%, 106%, o al menos 107% de proteína solubilizada puede ser obtenible usando las proteasas de la invención, haciendo referencia al modelo *in vitro* del ejemplo 8 de este documento. El término solubilización de proteínas básicamente significa llevar proteína(s) en la solución. Tal solubilización se puede deber a liberación mediada por proteasa de proteína de otros componentes de las composiciones naturales normalmente complejas, como alimento. Solubilización puede ser medida como un aumento en la cantidad de proteínas solubles, por referencia a una muestra con ningún tratamiento de proteasa (véase ejemplo 8).

50 [0164] El tratamiento según la invención de proteínas con al menos una proteasa de la invención produce una digestibilidad aumentada de proteínas, en comparación con la blanco. Al menos 101%, o 102%, 103%, 104%, 105%, 106%, 107%, 108%, 109%, 110%, 111%, 112%, 113%, 114%, 115%, o al menos 116% de proteína digerible puede ser obtenible usando las proteasas de la invención, haciendo referencia al modelo *in vitro* del ejemplo 8 de este documento.

55 [0165] En una forma de realización particular de un proceso de tratamiento, la proteasa(s) en cuestión afecta (o actúa en, o ejerce su influencia de solubilización en) las proteínas, como proteínas vegetales o fuentes de proteína. Para conseguir esto, la proteína o fuente de proteína se suspende típicamente en un solvente, por ejemplo, un solvente acuoso tal como agua, y el pH y valores de temperatura son ajustados prestando la debida atención a las características de la enzima en cuestión. Por ejemplo, el tratamiento puede ocurrir a un valor de pH en el que la actividad de la proteasa real es al menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, o al menos 90%. Asimismo, por ejemplo, el tratamiento puede ocurrir a una temperatura en la que la actividad de la proteasa real es al menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, o al menos 90%. Las indicaciones de porcentajes de actividad anteriores son en relación a las actividades máximas. La reacción enzimática es continua hasta que el resultado deseado se consigue, seguido de que esto puede o no puede detenerse inactivando la enzima, por ejemplo, por un paso de tratamiento térmico.

65

- 5 [0166] En otra forma de realización particular de un proceso de la invención de tratamiento, la acción de la proteasa se sostiene, significando, por ejemplo, que la proteasa se añade a las proteínas, pero su influencia de solubilización es por así decirlo no accionada hasta más tarde cuando se desea, una vez que condiciones de solubilización se establecen, o una vez que cualquier inhibidor enzimático se inactiva, o cualquier otros medios podrían haber sido aplicados para posponer la acción de la enzima.
- [0167] En una forma de realización el tratamiento es un pretratamiento de alimento para animales o proteínas para uso en el alimento para animales, es decir, las proteínas se solubilizan antes de la toma.
- 10 [0168] El término mejora del valor nutritivo de un alimento para animales significa mejorar la disponibilidad de las proteínas, conduciendo así a extracción de proteína aumentada, rendimiento de proteína mayor, y/o utilización de proteína mejorada. El valor nutritivo del alimento se aumenta por lo tanto y el índice de crecimiento y/o ganancia de peso y/o conversión de alimento (es decir, el peso de alimento ingerido en relación a aumento de peso) del animal es/son mejorado.
- 15 [0169] La proteasa se puede añadir al alimento en cualquier forma, ser este como una proteasa relativamente pura, o en la mezcla con otros componentes destinados para adición para alimento para animales, es decir, en forma de aditivos de alimento, como las denominadas pre-mezclas para alimento para animales.
- 20 [0170] En otro aspecto, la presente invención se refiere a composiciones para uso en el alimento para animales, como alimento para animales y aditivos de alimento, por ejemplo, premezclas.
- [0171] Además de la proteasa de la invención, los aditivos de alimento de la invención contienen al menos una vitamina liposoluble y/o al menos una vitamina hidrosoluble y/o al menos un oligoelemento y/o al menos un macromineral.
- 25 [0172] Además, ingredientes con aditivos de alimentos opcionales son agentes colorantes, por ejemplo, carotenoides como beta-caroteno, astaxantina y luteína; compuestos aromáticos; estabilizadores; péptidos antimicrobianos; ácidos grasos poliinsaturados; especies generadores de oxígeno reactivo; y/o al menos otra enzima seleccionada de entre fitasa (EC 3.1.3.8 o 3.1.3.26); xilanasa (EC 3.2.1.8); galactanasa (EC 3.2.1.89); alfa-galactosidasa (EC 3.2.1.22); proteasa (EC 3.4.-.-), fosfolipasa A1 (EC 3.1.1.32); fosfolipasa A2 (EC 3.1.1.4); lisofosfolipasa (EC 3.1.1.5); fosfolipasa C (3.1.4.3); fosfolipasa D (EC 3.1.4.4); amilasa como, por ejemplo, alfa-amilasa (EC 3.2.1.1); y/o beta-glucanasa (EC 3.2.1.4 o EC3.2.1.6).
- 30 [0173] En una forma de realización particular, estas otras enzimas son bien definidas (como definidas arriba para preparaciones de proteasa).
- 35 [0174] Ejemplos de péptidos antimicrobianos (AMP) son CAP18, Leucocin A, Tritrpticin, Protegrin-1, Thanatin, Defensin, Lactoferrin, Lactoferricin y Ovispirin como Novispirin (Robert Lehrer, 2000), Plectasins y Statins, incluyendo los compuestos y polipéptidos descritos en las WO 03/044049 y WO 03/048148, al igual que variantes o fragmentos de lo anterior que retienen actividad antimicrobiana.
- 40 [0175] Ejemplos de polipéptidos antifungicidas (AFP) son el *Aspergillus giganteus*, péptidos de *Aspergillus niger*, al igual que variantes y fragmentos de estos que retienen actividad antifúngica, como descritos en las WO 94/01459 y WO 02/090384.
- 45 [0176] Ejemplos de ácidos grasos poliinsaturados son ácidos grasos poliinsaturados C18, C20 y C22, como ácido araquidónico, ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentanoico y ácido gamma-linolénico.
- 50 [0177] Ejemplos de especies generadoras de oxígeno reactivo son productos químicos como perborato, persulfato, o percarbonato; y enzimas como una oxidasa, una oxigenasa o una sintetasa.
- [0178] Normalmente, grasa y vitaminas hidrosolubles, al igual que oligoelementos forman parte de una denominada premezcla destinada para adición al alimento, mientras que macrominerales se añaden normalmente por separado al alimento. Cualquiera de estos tipos de composición, cuando enriquecido con una proteasa de la invención, es un aditivo de alimento de la invención.
- 55 [0179] En una forma de realización particular, el aditivo de alimento de la invención se destina para ser incluido (o prescrito como que tiene que ser incluido) en dietas para animales o alimento a niveles de 0,01 a 10,0%; más particularmente 0,05 a 5,0%; o 0,2 a 1,0% (% significa g aditivo por 100 g de alimento). Esto es así en particular para premezclas.
- 60 [0180] Lo siguiente son listas no exclusivas de ejemplos de estos componentes:
- 65 Ejemplos de vitaminas liposolubles son vitamina A, vitamina D3, vitamina E y vitamina K, por ejemplo, vitamina K3.

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

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

Ejemplos de macrominerales son calcio, fósforo y sodio.

10 [0181] Los requisitos nutritivos de estos componentes (ejemplificados con ave y lechones/cerdos) se catalogan en la tabla A de WO 01/58275. Requisito nutritivo significa que estos componentes deberían ser proporcionados en la dieta en las concentraciones indicadas.

15 [0182] En la alternativa, el aditivo de alimento de la invención comprende al menos uno de los componentes individuales específicos en la tabla A de WO 01/58275. Al menos uno significa cualquiera de, uno o más de, uno, o dos, o tres, o cuatro, etcétera todos hasta trece, o todos hasta quince componentes individuales. Más específicamente, este al menos un componente individual se incluye en el aditivo de la invención en tal cantidad en cuanto a proporcionar una concentración en alimento en el intervalo indicado en la columna cuatro, o columna cinco, o columna seis de la tabla de A.

20 [0183] En todavía otra forma de realización, el aditivo de alimento de la invención comprende al menos una de las vitaminas de debajo, preferiblemente para proporcionar una concentración en peso en los intervalos específicos en la tabla I de debajo (para dietas de lechón y dietas de engorde, respectivamente).

Tabla I: Recomendaciones de vitamina típicas

25

Vitamina	Dieta de lechón	Dieta de engorde
Vitamina A	10,000-15,000 IU/kg de alimento	8-12,500 IU/kg de alimento
Vitamina D3	1800-2000 IU/kg de alimento	3000-5000 IU/kg de alimento
Vitamina E	60-100 mg/kg de alimento	150-240 mg/kg de alimento
Vitamina K3	2-4 mg/kg de alimento	2-4 mg/kg de alimento
Vitamina B1	2-4 mg/kg de alimento	2-3 mg/kg de alimento
Vitamina B2	6-10 mg/kg de alimento	7-9 mg/kg de alimento
Vitamina B6	4-8 mg/kg de alimento	3-6 mg/kg de alimento
Vitamin B12	0,03-0,05 mg/kg de alimento	0,015-0,04 mg/kg de alimento
Niacina (Vitamina B3)	30-50 mg/kg de alimento	50-80 mg/kg de alimento
Ácido Pantoténico	20-40 mg/kg de alimento	10-18 mg/kg de alimento
Ácido fólico	1-2 mg/kg de alimento	1-2 mg/kg de alimento
Biotina	0,15-0,4 mg/kg de alimento	0,15-0,3 mg/kg de alimento
Cloruro de colina	200-400 mg/kg de alimento	300-600 mg/kg de alimento

30 [0184] La presente invención también se refiere a composiciones de alimento para animales. Composiciones de alimento para animales o dietas tienen un contenido relativamente alto de proteína. Dietas de ave y de cerdo se pueden caracterizar como indicadas en la tabla B de la WO 01/58275, columnas 2-3. Dietas de pescado se pueden caracterizar como indicadas en la columna 4 de esta tabla B. Además tales dietas de pescado normalmente tienen un contenido de grasa cruda de 200-310 g/kg.

[0185] La WO 01/58275 corresponde a la US 09/779334, que se incorpora al presente documento por referencia.

- [0186] Una composición de alimento para animales según la invención tiene un contenido bruto de proteína de 50-800 g/kg y comprende además al menos una proteasa como se reivindica aquí.
- 5 [0187] Además, o en la alternativa (al contenido bruto de proteína indicado anteriormente), la composición de alimento para animales de la invención tiene un contenido de energía metabolizable de 10-30 MJ/kg; y/o un contenido de calcio de 0,1-200 g/kg; y/o un contenido de fósforo disponible de 0,1-200 g/kg; y/o un contenido de metionina de 0,1-100 g/kg; y/o un contenido de metionina más cisteína de 0,1-150 g/kg; y/o un contenido de lisina de 0,5-50 g/kg.
- 10 [0188] En formas de realización particulares, el contenido de energía metabolizable, proteína cruda, calcio, fósforo, metionina, metionina más cisteína y/o lisina está dentro de todos los intervalos 2, 3, 4 o 5 en la tabla B de la WO 01/58275 (R. 2-5).
- 15 [0189] Proteína cruda se calcula como nitrógeno (N) multiplicado por un factor 6,25, es decir, proteína cruda (g/kg)= N (g/kg) x 6,25. El contenido de nitrógeno se determina por el método Kjeldahl (A.O.A.C., 1984, *Official Methods of Analysis 14th ed.*, Association of Official Analytical Chemists, Washington DC).
- 20 [0190] Energía metabolizable puede calcularse basándose en la *NRC publication Nutrient requirements in swine, ninth revised edition 1988, subcommittee on swine nutrition, committee on animal nutrition, board of agriculture, national research council. National Academy Press, Washington, D.C., pp. 2-6*, y *European Table of Energy Values for Poultry Feed-stuffs, Spelderholt centre for poultry research and extension, 7361 DA Beekbergen, The Netherlands. Grafisch bedrijf Ponsen & looijen bv, Wageningen. ISBN 90-71463-12-5*.
- 25 [0191] El contenido dietético de calcio, fósforo disponible y aminoácidos en dietas para animales completas se calcula basándose en tablas de aliento como Veevoedertabel 1997, *gegevens over chemische samenstelling, verteerbaarheid en voederwaarde van voedermiddelen, Central Veevoederbureau, Runderweg 6, 8219 pk Lelystad. ISBN 90-72839-13-7*.
- 30 [0192] En una forma de realización particular, la composición de alimento para animales de la invención contiene al menos una proteína vegetal como se ha definido anteriormente. Puede también contener proteína animal, como harina de carne y huesos y/o harina de pescado, típicamente en una cantidad de 0-25%.
- 35 [0193] En todavía otras formas de realización particulares, la composición de alimento para animales de la invención contiene 0-80% de maíz; y/o 0-80% de sorgo; y/o 0-70% de trigo; y/o 0-70% de cebada; y/o 0-30% de avena; y/o 0-40% de harina de soja; y/o 0-25% de harina de pescado; y/o 0-25% de harina de carne y huesos; y/o 0-20% de lactosuero.
- 40 [0194] Dietas para animales pueden, por ejemplo, fabricarse como alimento triturado (no granulado) o alimento granulado. Típicamente, los materiales de alimento molidos se mezclan y cantidades suficientes de vitaminas esenciales y minerales se agregan según las especificaciones para las especies en cuestión. Enzimas se pueden añadir como formulaciones enzimáticas sólidas o líquidas. Por ejemplo, una formulación de enzima sólida se añade típicamente antes o durante el paso de mezcla; y una preparación enzimática líquida se añade típicamente después del paso de granulación. La enzima puede también ser incorporada en un aditivo de alimento o premezcla.
- 45 [0195] La concentración de enzima final en la dieta está en el intervalo de 0,01-200 mg de proteína enzimática por kg de dieta, por ejemplo, en el intervalo de 0,5-25 mg de proteína enzimática por kg de dieta animal.
- 50 [0196] La proteasa debería, por supuesto, ser aplicada en una cantidad eficaz, es decir, en una cantidad adecuada para mejora de solubilización, digestibilidad, y/o mejora de valor nutritivo de alimento. Actualmente, se contempla que la enzima se administra en una o más de las cantidades siguientes (intervalos de dosificación): 0,01-200, 0,01-100, 0,5-100, 1-50, 5-100, 10-100, 0,05-50 o 0,10-10, todos estos intervalos son en mg de proteína de proteasa por kg de alimento (ppm).
- 55 [0197] Para determinar mg de proteína de proteasa por kg de alimento, la proteasa se purifica de la composición alimentaria y la actividad específica de la proteasa purificada se determina usando un ensayo pertinente (ver debajo actividad de proteasa, sustratos y ensayos). La actividad de proteasa de la composición alimentaria como tal se determina también usando el mismo ensayo y basándose en estas dos determinaciones, la dosificación en mg de proteína de proteasa por kg de alimento se calcula.
- 60 [0198] Los mismos principios pueden determinar mg de proteína de proteasa en aditivos alimenticios. Por supuesto, si una muestra está disponible de la proteasa usada para preparar el aditivo de alimento o el alimento, la actividad específica se determina de esta muestra (sin necesidad de purificar la proteasa de la composición alimentaria o el aditivo).
- 65 **Composiciones detergentes**

[0199] La proteasa de la invención se puede añadir a y así hacerse un componente de una composición detergente.

[0200] La composición detergente de la invención puede, por ejemplo, formularse como composición de detergente para ropa a mano o a máquina que incluye una composición de aditivo de lavandería adecuada para pretratamiento de tejidos manchados y una composición de suavizante de enjuague añadida, o ser formulada como una composición detergente para uso en operaciones de limpieza de superficies duras del hogar en general, o ser formulada operaciones de lavado de la vajilla a mano o a máquina.

[0201] En un aspecto específico, la invención proporciona un aditivo detergente comprendiendo la proteasa de la invención. El aditivo detergente al igual que la composición detergente puede comprender una o más otras enzimas como otra proteasa, como proteasas alcalinas de *Bacillus*, una lipasa, una cutinasa, una amilasa, una carbohidrasa, una celulasa, una pectinasa, una mananasa, una arabinasa, una galactanasa, una xilanas, una oxidasa, por ejemplo, una lacasa y/o una peroxidasa.

[0202] En general, las propiedades de la enzima(s) elegida deberían ser compatibles con el detergente seleccionado, (es decir, pH óptimo, compatibilidad con otros ingredientes no enzimáticos y enzimáticos, etc.), y la enzima(s) debería estar presente en cantidades eficaces.

[0203] Lipasas adecuadas incluyen aquellas de origen fúngico o bacteriano. Proteínas químicamente modificadas o mutantes creadas genéticamente se incluyen. Ejemplos de lipasas útiles incluyen lipasas de *Humicola* (sinónimo de *Thermomyces*), por ejemplo, de *H. lanuginosa* (*T. Lanuginosus*) como se describe en las EP 258068 y EP 305216 o de *H. insolens* como se describe en la WO 96/13580, una lipasa de *Pseudomonas*, por ejemplo, *P. alcaligenes* o *P. pseudoalcaligenes* (EP 218272), *P. cepacia* (EP 331376), *P. stutzeri* (GB 1,372,034), *P. fluorescens*, *Pseudomonas* sp. cepa SD 705 (WO 95/06720 y WO 96/27002), *P. wisconsinensis* (WO 96/12012), una lipasa de *Bacillus*, por ejemplo, de *B. subtilis* (Dartois et al. (1993), *Biochemica et Biophysica Acta*, 1131, 253-360), *B. stearothermophilus* (JP 64/744992) o *B. pumilus* (WO 91/16422). Otros ejemplos son variantes de lipasa tales como las descritas en las WO 92/05249, WO 94/01541, EP 407225, EP 260105, WO 95/35381, WO 96/00292, WO 95/30744, WO 94/25578, WO 95/14783, WO 95/22615, WO 97/04079 y WO 97/07202. Enzimas de lipasa preferidas disponibles comercialmente incluyen Lipolase™ y Lipolase Ultra™ (Novozymes A/S). Amilasas adecuadas (beta y/o alfa) incluyen aquellas de origen fúngico o bacteriano. Proteínas químicamente modificadas o mutantes creadas genéticamente se incluyen. Amilasas incluyen, por ejemplo, alfa-amilasas obtenidas de *Bacillus*, por ejemplo, de una cepa especial de *B. licheniformis*, descrito con más detalle en la GB 1,296,839. Ejemplos de amilasas útiles son las variantes descritas en las WO 94/02597, WO 94/18314, WO 95/26397, WO 96/23873, WO 97/43424, WO 00/60060 y WO 01/66712, especialmente las variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 15, 23, 105, 106, 124, 128, 133, 154, 156, 181, 188, 190, 197, 202, 208, 209, 243, 264, 304, 305, 391, 408, y 444. Amilasas disponibles comercialmente son Natalase™, Supramyl™, Stainzyme™, Duramyl™, Termamyl™, Fungamyl™ y BAN™ (Novozymes A/S), Rapidase™ y Purastar™ (de Genencor International Inc.).

[0204] Celulasas adecuadas incluyen aquellas de origen fúngico o bacteriano. Proteínas químicamente modificadas o mutantes creadas genéticamente se incluyen. Celulasas adecuadas incluyen celulasas del género *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, por ejemplo, las celulasas fúngicas producidas de *Humicola insolens*, *Myceliophthora thermophila* y *Fusarium oxysporum* descritas en las US 4,435,307, US 5,648,263, US 5,691,178, US 5,776,757 y WO 89/09259. Celulasas especialmente adecuadas son las celulasas neutras o alcalinas con beneficios de cuidado de color. Ejemplos de tales celulasas son celulasas descritas en las EP 0 495257, EP 531372, WO 96/11262, WO 96/29397, WO 98/08940. Otros ejemplos son variantes de celulasa tales como las descritas en las WO 94/07998, EP 0 531 315, US 5,457,046, US 5,686,593, US 5,763,254, WO 95/24471, WO 98/12307 y WO 99/01544. Celulasas disponibles comercialmente incluyen Celluzyme™, y Carezyme™ (Novozymes A/S), Clazinase™ y Puradax HA™ (Genencor internacional Inc.), y KAC- 500(B)™ (Kao Corporation).

[0205] Peroxidasas/oxidases adecuadas incluyen aquellas origen de plantas, fúngico o bacteriano. Proteínas químicamente modificadas o mutantes creadas genéticamente se incluyen. Ejemplos de peroxidasas útiles incluyen peroxidasas de *Coprinus*, por ejemplo, de *C. cinereus* y variantes de esta como aquellas descritas en las WO 93/24618, WO 95/10602 y WO 98/15257. Peroxidasas disponibles comercialmente incluyen Guardzyme™ (Novozymes).

[0206] La enzima(s) detergente se puede incluir en una composición detergente añadiendo aditivos separados con una o más enzimas, o añadiendo un aditivo combinado comprendiendo todas estas enzimas. Un aditivo detergente de la invención, es decir, un aditivo separado o un aditivo combinado, se puede formular por ejemplo, como un granulado, un líquido, un lodo, etc. Formulaciones de aditivo detergente preferidas son granulados, en particular, granulados no polvorientos, líquidos, en particular, líquidos estabilizados, o compuestos acuosos.

[0207] Granulados no polvorientos pueden producirse, por ejemplo, como se describe en las US 4,106,991 y 4,661,452 y pueden opcionalmente revestirse por métodos conocidos en la técnica. Ejemplos de materiales de recubrimiento cerosos son productos de poli(óxido de etileno) (polietilenglicol; PEG) con pesos molares medios de 1000 a 20000; nonilfenoles etoxilados con de 16 a 50 unidades de óxido de etileno; alcoholes etoxilados grasos en los que el alcohol contiene de 12 a 20 átomos de carbono y en los cuales hay de 15 a 80 unidades de óxido de

- 5 etileno; alcoholes grasos; ácidos grasos; y mono y di- y triglicéridos de ácidos grasos. Ejemplos de materiales de recubrimiento que forman películas adecuadas para aplicación por técnicas de lecho fluidificado se dan en la GB 1483591. Preparaciones enzimáticas líquidas pueden, por ejemplo, estabilizarse añadiendo un poliol tal como propilenglicol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico o ácido bórico según métodos establecidos. Enzimas protegidas se pueden preparar según el método descrito en la EP 238216.
- 10 [0208] La composición detergente de la invención puede estar en cualquier forma conveniente, por ejemplo, una barra, una pastilla, un polvo, un gránulo, una pasta o un líquido. Un detergente líquido puede ser acuoso, típicamente con hasta 70 % de agua y 0-30 % disolvente orgánico, o no acuoso.
- 15 [0209] La composición detergente comprende uno o más tensioactivos, que pueden ser no iónico incluyendo semipolar y/o aniónico y/o zwitteriónico y/o catiónico. Los tensioactivos están presentes típicamente a un nivel de 0,1 % a 60% en peso.
- 20 [0210] Cuando se incluye aquí el detergente normalmente contiene de aproximadamente 1% a aproximadamente 40% de un surfactante aniónico tal como alquilbencenosulfonato lineal, alfa-olefinsulfonato, sulfato de alquilo (sulfato de alcohol graso), etoxisulfato alcohólico, alcanosulfonato secundario, alfa-sulfo ácido graso de metil éster, ácido alquil- o alquensuccínico o jabón.
- 25 [0211] Cuando se incluye aquí el detergente normalmente contiene de aproximadamente 0,2% a aproximadamente 40% de un surfactante no iónico tal como alcohol etoxilato, nonilfenol, etoxilato alquilpoliglicósido, óxido de alquildimetilamina, monoetanolamida de ácido graso etoxilado, monoetanolamida de ácido graso, amida de polidroxil alquil ácido gras, o derivados de N-acil N-alquil glucosamina ("glucamidas").
- 30 [0212] El detergente puede contener 0-65 % de un constructor de detergente o agente complejo tal como zeolita, difosfato, trifosfato, fosfonato, carbonato, citrato, ácido nitrilotriacético, ácido etilendiaminatetraacético, ácido dietilenoetriamino-pentaacético, ácido alquil- o alquensuccínico, silicatos solubles o silicatos estratificados (p. ej. SKS-6 de Hoechst).
- 35 [0213] El detergente puede comprender uno o más polímeros. Ejemplos son carboximetilcelulosa, poli(vinilpirrolidona), poli(etilenglicol), poli(vinil alcohol), poli(vinilpiridina-N-óxido), poli(vinilimidazole), policarboxilatos tales como poliacrilatos, copolímeros de ácido maléico/acrílicos y copolímeros de ácido de lauril metacrilato/acrílico.
- [0214] El detergente puede contener un sistema blanqueante que puede comprender una fuente de H₂O₂ tal como perborato o percarbonato que se puede combinar con un activador blanqueante de formación de perácido tal como tetraacetiltilenodiamina o nonanoiloxibencenosulfonato. Alternativamente, el sistema blanqueante puede comprender peroxiacidos del tipo, por ejemplo, amida, imida, o sulfona.
- 40 [0215] La enzima(s) de la composición detergente de la invención puede estabilizarse usando agentes convencionales estabilizantes, por ejemplo, un poliol tal como propilenglicol o glicerol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico, ácido bórico, o un derivado de ácido bórico, por ejemplo, un éster de borato aromático, o un derivado de ácido fenil borónico tal como 4-formilfenil ácido borónico, y la composición se puede formular como se describe en, por ejemplo, las WO 92/19709 y WO 92/19708.
- 45 [0216] El detergente puede también contener otros ingredientes de detergentes convencionales como, por ejemplo, acondicionadores de tejidos incluyendo arcillas, reforzadores de espuma, supresores de espuma, agentes anticorrosivos, agentes de suspensión de suciedad, agentes de reposición antisuciedad, tintes, bactericidas, blanqueadores ópticos, hidrotropos, inhibidores de decoloración, o perfumes.
- 50 [0217] Actualmente, se contempla que en las composiciones detergentes cualquier enzima, en particular, la enzima de la invención, se puede añadir en una cantidad correspondiente a 0,01-100 mg de proteína enzimática por litro de líquido de lavado, preferiblemente 0,05-5 mg de proteína enzimática por litro de líquido de lavado, en particular, 0,1-1 mg de proteína enzimática por litro de líquido de lavado.
- 55 [0218] La enzima de la invención puede adicionalmente incorporarse en las formulaciones detergentes descritas en la WO 97/07202.

Depósito de material biológico

- 60 [0219] Los siguientes materiales biológicos han sido depositados según las condiciones del tratado de Budapest con el DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig; Alemania), y ha dado los siguientes números de registro:

Depósito	Fecha de acceso	Fecha de depósito
65 <i>Nocardioopsis</i> sp.	DSM 16424	24 de mayo de 2004
<i>Nocardioopsis prasina</i>	DSM 15649	30 de mayo de 2003

Prasina de *Nocardioopsis* (previamente *alba*) DSM 14010

20 de enero de 2001

[0220] Estas cepas han sido depositadas bajo condiciones que aseguran que acceso al cultivo estará disponible durante la pendency de esta solicitud de patente para uno determinado por el comisario de patentes y marcas registradas para ser titulado aquí bajo 37 C.F.R. §1.14 and 35 U.S.C. §122. El depósito representa un cultivo substancialmente puro de la cepa depositada. El depósito está disponible según sea necesario por leyes de patentes extranjeras en países donde contrapartes de la presente solicitud, o su progenie son solicitados. No obstante, se debe entender que la disponibilidad de un depósito no constituye una licencia para practicar la presente invención en derogación de los derechos de patente concedida por acción gubernamental.

[0221] Cepa DSM 15649 fue aislada en 2001 de una muestra de suelo de Dinamarca.

[0222] Las siguientes cepas están disponibles públicamente de DSM

<i>Nocardioopsis dassonvillei</i> subesp. <i>dassonvillei</i>	DSM 43235
<i>Nocardioopsis alkaliphila</i>	DSM 44657
<i>Nocardioopsis lucentensis</i>	DSM 44048

[0223] *Nocardioopsis dassonvillei* subesp. cepa de *dassonvillei* DSM 43235 fue también depositada en otras instituciones de depósito de la siguiente manera: ATCC 23219, IMRU 1250, NCTC 10489.

Ejemplos

Ejemplo 1: Clonación y expresión de tres proteasas (L1a, L1b y L1c)

Reactivos y medios

[0224]

LB agar	Descrito en Ausubel, F. M. et al. (eds.) "Current protocols in Molecular Biology" John Wiley and Sons, 1995;
LB-PG agar	LB agar complementado con 0,5% de glucosa y 0,05 M de fosfato potásico, pH 7,0
PS-1	10% de sacarosa, 4% de harina de soja, 1% de Na ₃ PO ₄ · 12H ₂ O, 0,5% de CaCO ₃ y 0,01% ácido plurónico
TE	10 mM de Tris-HCl, pH 7,4 1 mM de EDTA, pH 8,0
TEL	50 mg/ml de Lisozym en el tampón TE
Thiocyanate	5M de tiocianato de guanidinio 100 mM de EDTA 0,6 % p/v de N-laurilsarcosina, sal de sodio 60 g thiocyanate, 20 ml 0,5 M de EDTA, pH 8,0, 20 ml de H ₂ O se disuelve a 65°C. Refrigeración a temperatura ambiente (RT) y adición de 0,6 g de N-laurilsarcosina. Adición de H ₂ O a 100 ml y filtrado a través de un filtro estéril 0,2 µ.
NH ₄ Ac	7,5 M de CH ₃ COONH ₄
TER	1 µg/ml de ribonucleasa pancreática en el tampón TE
CIA	cloroformo/isoamil alcohol 24:1

Fermentación de cepas de *Nocardioopsis*

[0225] Cada una de las cepas de *Nocardioopsis dassonvillei* subesp. *dassonvillei* DSM 43235, *Nocardioopsis prasina* DSM 15649 y *Nocardioopsis prasina* (previamente *alba*) DSM 14010 se cultivaron durante 3 días antes de recogida, en el siguiente medio a 30°C:

Tripticasa	20 g
Extracto de levadura	5 g
Ferrocianuro	6 mg
Sulfato de magnesio	15 mg

Agua destilada hasta 1000 ml
pH ajustado a 9 por adición de carbonato de sodio.

Preparación de ADN genómico

5 [0226] ADN genómico se aisló según el siguiente procedimiento:

1. Recogida de 1,5 ml de cultivo y resuspender en 100 µl de TEL.
Incubar a 37°C durante 30 min.
- 10 2. Adición de 500 µl de tampón de tiocianato y dejar a temperatura ambiente durante 10 min.
3. Adición 250 µl de NH₄Ca y dejar en hielo durante 10 min.
- 15 4. Adición de 500 µl de CIA y mezclar.
5. Transferencia a un micro-centrifugador y giro durante 10 min. a toda velocidad.
- 20 6. Transferencia de sobrenadante a un nuevo tubo de Eppendorf y añadir 0,54 de volumen de isopropanol frío.
Mezclar completamente.
7. Girado y lavado del granulado de ADN con 70% de EtOH.
- 25 8. Resuspensión el ADN genómico en 100 µl de TER.

Construcción de cepas de expresión de *Bacillus subtilis* Sav-L1a, Sav-L1b y Sav-L1c

30 [0227] La región de codificación para la proteasa pro-madura L1a (nucleótidos 88-1143 de la SEC ID n°: 1) se amplificaron con los siguientes cebadores 1424 y 1485 en el ADN genómico aislado de *Nocardioopsis dassonvillei* subesp. *dassonvillei* DSM 43235:

35 Cebador 1485 (SEC ID n°: 14): 5'-gcttttagttcatcgatcgcatcggtgctgacgacctaccggccgagccag-3'
Cebador 1424 (SEC ID n°: 15): 5'-ggagcggattgaacatgcatgactaaccgggtcaccaggggacagcc-3'

[0228] La región de codificación para la proteasa pro-madura L1b (nucleótidos 88-1149 de la SEC ID n°: 3) se amplificó con los siguientes cebadores 1751 y 1753 en el ADN genómico aislado de *Nocardioopsis prasina* DSM15649:

40 1751 (SEC ID n°: 16): 5'-gttcatcgatcgcatcggtgtcaccgcaccaccgagcc-3'
1753 (SEC ID n°: 17): 5'-ggagcggattgaacatgcatgactgctgacgaggtgaggttc-3'

45 [0229] La región de codificación para la proteasa pro-madura L1c (nucleótidos 88-1149 de la SEC ID n°: 5) se amplificó con los siguientes cebadores 1755 y 1756 en el ADN genómico aislado de *Nocardioopsis prasina* DSM14010:

1755 (SEC ID n°: 18): 5'-gttcatcgatcgcatcggtgtgaccgccccgagcc-3'
1756 (SEC ID n°: 19): 5'-ggagcggattgaacatgcatgactgctgacgaggtgaggttc-3'

50 [0230] Cada uno de estos polinucleótidos L1a, L1b, y L1c se fundieron, por PCR, en el marco a un fragmento ADN heterólogo que codifica un péptido de señal Sav (SEC ID n°: 13).

[0231] Cepas de *Bacillus subtilis* designada Sav-L1 a, Sav-L1b, y Sav-L1c, respectivamente, se construyeron por incorporación de estos genes (incluyendo la parte de codificación de péptido de señal) por recombinación homóloga en el genoma de *Bacillus subtilis* MB1053 de célula huésped (WO03/95658). Los genes se expresaron bajo el control de un sistema promotor triple (como descrito en la WO 99/43835), que consiste en los promotores de gen de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (amyL), gen de alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (amyQ), y el promotor cryIIIA de *Bacillus thuringiensis* incluyendo secuencia estabilizadora. La codificación de gen para acetiltransferasa de cloranfenicol fue usado como marcador (descrito en, por ejemplo, Diderichsen, B.; Poulsen, G.B.; Joergensen, S.T.; *A useful cloning vector for Bacillus subtilis. Plasmid 30:312 (1993)*).

[0232] Transformantes resistentes al cloranfenicol se controlaron para actividad de proteasa en 1% de placas de agar LB-PG de leche desnatada (complementado con 6 µg/ml de cloranfenicol). Algunas colonias positivas de proteasa fueron además analizadas por secuenciación del ADN del inserto para confirmar la secuencia de ADN correcta, y una cepa para cada construcción se seleccionó.

Fermentación de cepas de huésped de *Bacillus*

5 [0233] Cada una de las cepas huésped de *Bacillus subtilis* transformadas se fermentaron en una tabla de agitación giratoria (250 r.p.m.) en matraces de Erlenmeyer 500 ml disipados con 100 ml de medio PS-1 complementado con 6 µg/ml de cloranfenicol, a 37°C durante 16 horas, y a 26°C para 4 días extra.

Ejemplo 2: Clonación y expresión de proteasa L2a

10 [0234] La pro-forma de un gen de codificación de proteasa (nucleótidos 88-1152 de la SEC ID n°: 7) se aisló de *Nocardiosis* sp. DSM 16424 por el procedimiento descrito en el ejemplo 1, salvo el uso de los siguientes cebadores:

1718 (SEC ID n°: 20): 5'-gttcatcgatcgatcggtgcccggccccgtccccag-3'
1720 (SEC ID n°: 21): 5'-ggagcggattgaacatgcatcgatcgatggtgctgagcgaac-3'.

15 [0235] La proteasa correspondiente (SEC ID n°: 8) se designó L2a.

[0236] Una cepa huésped de *Bacillus subtilis* designada Sav-L2a se construyó, como también generalmente se describe en el ejemplo 1, y una colonia positiva de proteasa resistente al cloranfenicol se seleccionó y se analizó por secuenciación del ADN del inserto.

Ejemplo 3: Clonación de dos proteasas adicionales

25 [0237] Las pro-formas de dos genes de codificación de proteasas adicionales (nucleótidos 88-1149 de la SEC ID n°: 9, y nucleótidos 88-1152 de la SEC ID n°: 11, respectivamente) se aislaron de *Nocardiosis alkaliphila* DSM 44657, y de *Nocardiosis lucentensis* DSM 44048, respectivamente, por el procedimiento descrito en el ejemplo 1, salvo el uso de cebadores 1728 y 1763; y 1747 y 1749, respectivamente:

1728 (SEC ID n°: 22): 5'-gttcatcgatcgatcggtgcccggccccagtc-3'
1763 (SEC ID n°: 23): 5'-ggagcggattgaacatgcatcgattaggtgctgagcagcaggccccca-3';
1747 (SEC ID n°: 24): 5'-gttcatcgatcgatcggtggaaccgtaccacccccag-3'
1749 (SEC ID n°: 25): 5'-ggagcggattgaacatgcatgattagctggtgctgagtcgac-3'

35 [0238] Las proteasas correspondientes (SEC ID n°: 10 y 12, respectivamente) se designaron L2b, y L2c, respectivamente.

[0239] Cepas huésped de *Bacillus subtilis* designadas Sav-L2b y Sav-L2c, respectivamente, se construyen, como también se describe generalmente en el ejemplo 1, y, colonias positivas de proteasa resistentes al cloranfenicol se seleccionan y se analizan por secuenciación del ADN de los insertos.

Ejemplo 4: Purificación y caracterización de la proteasa L1a

Ensayos de proteasa

45 1) ensayo pNA:

[0240]

50 sustrato de pNA: Suc-AAPF-pNA (Bachem L-1400).
Temperatura: temperatura ambiente (25°C)
Tampones de ensayo: 100mM de ácido succínico, 100mM de HEPES, 100mM de CHES, 100mM de CABS, 1 mM de CaCl₂, 150mM de KCl, 0,01% de Tritón X-100 ajustado a valores de pH 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0, 11,0 y 12,0 con HCl o NaOH.

55 [0041] 20µl de proteasa (diluida en 0,01% de Tritón X-100) se mezcla con 100µl de tampón de ensayo. El ensayo se comienza por adición de 100µl de sustrato pNA (50mg disuelto en 1,0ml de DMSO y además diluido 45x con 0,01% de Tritón X-100). El aumento en OD405 se monitorea como una medida de la actividad de proteasa.

60 2) Ensayo de protazyme AK:

[0042]

Sustrato: comprimido de Protazyme AK (reticulado y caseína teñida; de Megazyme)
Temperatura: controlada (ensayo temperatura).

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

5 [0043] Un comprimido de Protazyme AK se suspende en 2,0ml de Tritón X-100 0,01% por agitación suave. 500R I de esta suspensión y 500µl de tampón de ensayo se mezclan en un tubo de Eppendorf y se colocan en hielo. 20µl de muestra de proteasa (diluida en Tritón X-100 0,01%) se añade. El ensayo se inicia por transferencia del tubo de Eppendorf a un termomezclador Eppendorf, que se fija a la temperatura de ensayo. El tubo se incuba durante 15 minutos en el termomezclador Eppendorf a su índice de agitación máximo (1400 r.p.m.). La incubación se detiene por transferencia del tubo de nuevo al baño de hielo. Luego, el tubo se centrifuga en un centrifugador *icecold* durante unos minutos y 200µl de sobrenadante se transfirieron a una placa de microtitulación. OD650 se lee como una medida de actividad de proteasa. Un tampón ciego se incluye en el ensayo (en vez de enzima).

15 Purificación

15 [0244] El huésped de *Bacillus* transformado que expresa la L1 una proteasa descrita en el ejemplo 1 se fermentó como se describe también en el ejemplo 1, pero a 26°C durante 6 días. El caldo de cultivo se centrifugó (20000 x g, 20 min) y los sobrenadantes se decantaron cuidadosamente de los precipitados. Los sobrenadantes combinados se filtraron a través de una placa Seitz EKS para eliminar las células huésped de *Bacillus* restantes. El EKS filtrado se transfirió a 50mM de H₃BO₃, 5mM de ácido succínico, 1mM de CaCl₂, pH 7 en una columna Sefadex G25. Sulfato amónico sólido se añadió a la solución enzimática de la columna Sefadex G25 para dar una concentración final de 1,6M de (NH₄)₂SO₄ en la solución enzimática. La solución enzimática se mezcló suavemente con un agitador magnético durante la adición de (NH₄)₂SO₄ y la agitación se continuó durante 30 minutos después de la adición para llevar al sistema al equilibrio. Luego, la solución enzimática se aplicó a una columna de Butil Toyopearl equilibrada en 100mM de H₃BO₃, 10mM de ácido succínico, 2mM de CaCl₂, 1,6M de (NH₄)₂SO₄, pH 7. Después del lavado de la columna extensivamente con el tampón de equilibrio, la proteasa se eluyó con un gradiente lineal (NH₄)₂SO₄ (1,6 a 0M) en el mismo tampón. Proteasa con fracciones se agruparon y se transfirieron a 20mM de HEPES, pH 8 en una columna Sefadex G25 y aplicada a una columna Q sefarosa FF equilibrada en el mismo tampón. Después del lavado de la columna extensivamente con el tampón de equilibrio, la proteasa se eluyó con un gradiente de NaCl lineal (0 a 0,5M) en el mismo tampón. Fracciones de la columna se analizaron para actividad de proteasa (usando el ensayo Suc-AAPF-pNA a pH 9) y fracciones activas se analizaron además por SDS-PAGE. Fracciones con una única banda (como juzgada por un gel de SDS-PAGE manchado de coomassie) se agruparon para proporcionar la preparación purificada que se usó para otra caracterización.

35 [0245] La proteasa L1a se caracterizó como se describe abajo, en comparación con la otra proteasa derivada de *Nocardiosis dassonvillei* subesp. *dassonvillei* DSM 43235, preparada: como se describe en la WO 2004/111220 (en lo que sigue para abreviar designado "la proteasa L2").

40 Actividad de pH, estabilidad de pH y actividad de temperatura

40 [0246] El ensayo pNA se usó para el obtener el perfil de la actividad de pH al igual que el perfil de estabilidad de pH. Para el perfil estabilidad de pH, la proteasa se diluyó 10x en los tampones de ensayo y se incubó durante 2 horas a 37°C. Tras la incubación, las muestras de proteasa se transfirieron al mismo pH (pH 9), antes de ensayo para actividad residual, por dilución en el tampón de ensayo pH. El ensayo Protazyme AK se usó para el obtener el perfil de actividad de temperatura a pH 9. Los resultados se muestran en tablas 1-3 de debajo.

Tabla 1: Perfil de actividad de pH

pH	Proteasa L1a	Proteasa L2
2	0,00	0,00
3	0,00	0,00
4	0,02	0,03
5	0,10	0,11
6	0,25	0,21
7	0,38	0,37
8	0,66	0,71
9	0,97	0,97
10	1,00	1,00
11	0,99	0,94

12	0.94	-
----	------	---

Tabla 2: Perfil de estabilidad de pH

pH	Proteasa L1a	Proteasa L2
2,0	0,50	1,00
2,5	0,81	0,95
3,0	0,93	0,97
3,5	0,94	1,01
4,0	0,97	0,98
5,0	0,96	0,97
6,0	0,95	0,98
7,0	0,99	0,96
8,0	0,97	0,99
9,0	0,93	0,99
10,0	0,94	0,96
11,0	0,94	0,94
12,0	0,92	0,84
9,0 y tras 2 horas a 5 °C	1,00	1,00

Tabla 3: Perfil de actividad de temperatura

Temperatura (°C)	Proteasa L1a	Proteasa L2
15	0,11	0,01
25	0,17	0,01
37	0,30	0,03
50	0,58	0,09
60	0,90	0,19
70	1,00	0,63
80	0,34	1,00
90	-	0,35

5

Otras características

[0247] La proteasa L1a es una proteasa alfa-lítica como enzima (familia de peptidasa S1E, notación antigua S2A) que se descubre que se inhibe por fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF) y por el inhibidor de subtilisina de Streptomyces (SSI). Su peso molecular relativo como determinado por SDS-PAGE es Mr = 22kDa, y la secuencia N-terminal: ADIVGGEAY (SEC ID n°: 26).

Ejemplo 5: Actividad específica de la proteasa L1a

[0248] La preparación de proteasa purificada descrita en el ejemplo 4 se usó para determinación de la actividad específica. La pureza de la preparación fue de sobre 95% cuando se analizó por SDS-PAGE (determinado como se describe en el ejemplo 2A en la WO 01/58275). La muestra de proteasa se dividió en dos. Una parte se analizó para el contenido de proteína (mg/ml) por análisis de aminoácido, la otra parte se analizó para actividad de proteasa.

Análisis de aminoácido (AAA)/(mg/ml)

[0249] Los enlaces peptídicos de la muestra de proteasa se sometieron a hidrólisis ácida, seguido de separación y

cuantificación de los aminoácidos liberados en un Biochrom 20 Plus Amino Acid Analyser, disponible comercialmente de Bie & Bemsen A/S, Sandbaekvej 5-7, DK-2610 Roedovre, Dinamarca, según las instrucciones del fabricante. Para la hidrólisis ácida, la muestra de proteína se secó en un centrifugador de vacío, se resolvió en 18,5% (vol/vol) de HCl + 0,1% (vol/vol) de fenol y se incubó durante 16hr a 110°C. Tras la incubación, la muestra se secó otra vez en el centrifugador de vacío, se resolvió en el tampón de carga (0,2 M de Na-citrato, pH 2,2) y se cargó sobre el Biochrom 20 Plus Amino Acid Analyser.

[0250] Para la cuantificación, la muestra hidrolizada se cargó sobre una columna de la resina de intercambio de catión UltroPac n°. 8, forma de sodio, que está disponible comercialmente de Bie & Bemsen A/S, catalogue no. 80-2104-15. Tampones de pH variable (de pH 1 a pH 8) y fuerza iónica se bombearon a través de la columna según las instrucciones del fabricante referido anteriormente, para separar varios aminoácidos. La temperatura de columna se controló con precisión, también según las instrucciones del fabricante (de 53°C a 92°C y de nuevo a 53°C) para asegurar la separación requerida. El eluyente de columna se mezcló con reactivo de ninhidrina (Bie & Bemsen, catálogo n°. 80-2038-07) y la mezcla se pasó a través de la bobina de reacción de alta temperatura del analizador de aminoácido. En la bobina de reacción, ninhidrina reaccionada con los aminoácidos para formar compuestos coloreados, la cantidad de lo cual fue directamente proporcional a la cantidad de aminoácido presente.

Ensayo de actividad de proteasa (AU/ml)

[0251] Hemoglobina desnaturalizada (0,65% (p/p) en 6,7mM de tampón KH₂PO₄/NaOH, pH 7,50) se degradó a 25°C durante 10 minutos por la proteasa y hemoglobina no asimilada se precipitó con (TCA) de ácido tricloroacético y se quitó por filtración. Los productos ATC-solubles de degradación de hemoglobina en el filtrado se determinaron con reactivo fenol de Folin & Ciocalteu, que da un color azul con diferentes aminoácidos. La unidad de actividad (AU) se definió y se midió por referencia a un estándar de ALCALASE™. Una descripción detallada del ensayo, al igual que una muestra del estándar de ALCALASE™, está disponible a petición de Novozymes A/S, Krogshoejvej 36, DK-2880 Bagsvaerd, Dinamarca (ensayo n°. EB-SM-0349.02/01).

[0252] La actividad específica se calculó como: actividad específica (AU/g) = (actividad (AU/ml) / AAA (mg/ml)) x 1000 (mg/g).

[0253] La actividad específica de proteasa L1a fue 49,8 AU/g, en comparación con la actividad específica de la proteasa derivada de *Nocardioopsis* sp. NRRL 18262 de 38,3 AU/g.

Ejemplo 6: Purificación y caracterización de la proteasa L2a

[0254] El huésped de *Bacillus* transformado que expresa la proteasa L2a descrita en el ejemplo 2 se fermentó como se describe en el ejemplo 1, pero a 30°C durante 5 días. El caldo de cultivo se centrifugó (20000 x g, 20 min) y los sobrenadantes se decantaron cuidadosamente de los precipitados. Los sobrenadantes combinados se filtraron a través de una placa Seitz EKS para eliminar las células huésped de *Bacillus* restantes. El filtrado EKS se transfirió a 50mM de H₃BO₃, 5mM de ácido succínico, 1 mM de CaCl₂, pH 7 en una columna Sefadex G25 y se aplicó a una columna de sílice de bacitracina equilibrada en el mismo tampón. Después del lavado de la columna de bacitracina extensivamente con el tampón de equilibrio, la proteasa se eluyó por fases con 100mM de H₃BO₃, 10mM de ácido succínico, 2mM de CaCl₂, 1 M de NaCl, 25% de isopropanol, pH 7. El eluato de bacitracina se transfirió a 50mM de H₃BO₃, 10mM de CH₃COOH, 1mM de CaCl₂, pH 4,5 en una columna Sefadex G25 y se aplicó a una columna S sefarosa HP equilibrada en el mismo tampón. Después del lavado de la columna extensivamente con el tampón de equilibrio, la proteasa se eluyó con un gradiente de NaCl lineal (0 a 0,5M) en el mismo tampón. Fracciones de la columna se analizaron para actividad de proteasa (usando el ensayo Protazyme AK a 37°C y pH 9) y fracciones activas se analizaron además por SDS-PAGE. Fracciones con una única banda se agruparon (como juzgada por un gel de SDS-PAGE manchado de coomassie) para proporcionar la preparación purificada que fue usada para otra caracterización.

[0255] La proteasa L2a se caracterizó como se describe en el ejemplo 4 de arriba, en comparación con una proteasa conocida derivada de *Nocardioopsis* sp. NRRL 18262 (para abreviar designada "Proteasa 10"). Los resultados se muestran en las tablas 4-6 de debajo.

Tabla 4: Perfil de actividad pH

pH	Proteasa L2a	Proteasa 10
2	0,00	-
3	0,00	0,00
4	0,02	0,02
5	0,10	0,07
6	0,22	0,21

7	0,41	0,44
8	0,75	0,67
9	0,97	0,88
10	0,99	1,00
11	1,00	0,93
12	0,85	-

Tabla 5: Perfil de estabilidad de pH

pH	Proteasa L2a	Proteasa 10
2,0	0,67	0,78
2,5	0,93	1,00
3,0	0,95	1,03
3,5	0,96	0,98
4,0	0,97	0,99
5,0	0,94	1,02
6,0	0,95	1,00
7,0	0,97	1,01
8,0	0,96	0,98
9,0	0,95	0,99
10,0	0,96	0,99
11,0	0,90	0,86
12,0	0,60	-
y después 2 horas a 5 °C	1,00	1,00

5

Tabla 6: Perfil de estabilidad de pH

Temperatura (°C)	Proteasa L2a	Proteasa 10
15	0,02	0,02
25	0,02	0,02
37	0,05	0,07
50	0,13	0,20
60	0,31	0,51
70	0,79	1,00
80	1,00	0,39
90	0,28	-

Otras características

10 [0256] La proteasa L2a es una proteasa alfa-lítica como enzima (familia de peptidasa S1E, notación antigua S2A) que se ha descubierto que se inhibe por metil fenil sulfonil fluoruro (PMSF). Su peso molecular relativo como determinado por SDS-PAGE es Mr = 20kDa y la secuencia N-terminal: ANIIGGLAYT (SEC ID nº: 27).

Ejemplo 7: Temperatura de fusión de la proteasa L2a

15

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

[0257] Calorimetría por análisis diferencial se usó para determinar estabilidad de temperatura a pH 7,0 de la proteasa L2a derivada de *Nocardioopsis* sp. DSM 16424. La proteasa se purificó como se describe en el ejemplo 6 y se dializó durante la noche a 4°C contra 10 mM de fosfato sódico, 50 mM de cloruro sódico, pH 7,0 y se condujo en un instrumento de calorimetría por análisis diferencial de vasopresina (Micro Cal) con una tasa de barrido constante de 1,5°C/min de 20 a 100°C. Manipulación de datos se realizó usando el software Microcal Origin.

[0258] La desnaturalización resultante o temperatura de fusión (T_m o T_d), fue 78,2°C. La T_m para proteasa 10 es 76,5°C.

Ejemplo 8: Rendimiento de la proteasa L2a en un modelo de digestión monogástrica *in vitro*

[0259] El rendimiento de la proteasa L2a purificada descrita en ejemplo el 6 se evaluó en un modelo *in vitro* que simula la digestión en animales monogástricos, en comparación con la proteasa conocida derivada de *Nocardioopsis* sp. NRRL 18262 ("Proteasa 10"). En particular, la proteasa se evaluó para su capacidad para mejorar solubilización y digestión de maíz-SBM (comida de maíz/semilla de soja) proteínas. El sistema *in vitro* consistía en 18 matraces en el que el sustrato maíz/- SBM se incubó inicialmente con HCl/pepsina, simulación de digestión gástrica, y posteriormente con pancreatina, simulación de digestión intestinal. Ocho de los matraces se dosificaron con la proteasa al principio de la fase gástrica mientras que los diez matraces restantes sirvieron como blancos. Al final de la fase de incubación intestinal, muestras de digesta *in vitro* se quitaron y se analizaron para proteína digerida y solubilizada.

Perfil del procedimiento de digestión *in vitro*

Componentes añadidos	pH	Temperatura	Curso del tiempo	Fase de digestión simulada
10 g de sustrato de maizel-SBM (6:4), 41 ml de HCl (0,105M)	3,0	40°C	t=0 min	Mezcla
5 ml de HCl (0, 1 05M) / pepsina (3000 U/g de sustrato), 1 ml de proteasa (para proporcionar 100 mg de enzima proteasa por kg de sustrato)	3,0	40°C	t=30 min	Digestión gástrica
16 ml de H ₂ O	3,0	40°C	t= 1,0 hora	Digestión gástrica
7 ml de NaOH (0,39M)	6,8	40°C	t=1,5 horas	Digestión intestinal
5 ml de NaHCO ₃ (1 M) / pancreatina (8 mg/g de dieta)	6,8	40°C	t=2,0 horas	Digestión intestinal
Terminación de la incubación	7,0	40°C	t=6,0 horas	

Condiciones

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

Soluciones

[0260]
 0,39 M de NaOH
 0,105 M de HCl
 0,105 M de HCl con 6000 U de Pepsina por 5 ml
 1 M de NaHCO₃ con 16 mg de pancreatina por ml
 125 mM de NaAc-tampón, pH 6,0

Determinaciones de proteína enzimática

[0261] La cantidad de proteína de enzima proteasa (EP) se calcula basándose en los valores A280 y las secuencias de aminoácidos (composiciones de aminoácido) usando los principios perfilados en S.C.Giil & P.H. von Hippel, Analytical Biochemistry 182, 319-326, (1989).

5 Procedimiento experimental para modelo *in vitro*

[0262] El procedimiento experimental fue según el anterior perfil. El pH se midió a tiempo de 1, 2.5, y 5,5 horas. Incubaciones se terminaron después de 6 horas y muestras de 30 ml se quitaron y se colocaron en el hielo antes de centrifugado (10000 x g, 10 min, 4°C). Los sobrenadantes se quitaron y se almacenaron a -20°C.

10 Análisis

[0263] Todas las muestras se analizaron para el contenido proteína digerida y solubilizada usando filtración en gel.

15 Estimación de proteína digerida y solubilizada

[0264] El contenido de proteína solubilizada en sobrenadantes de muestras digeridas *in vitro* se estimó por cuantificación de proteína cruda (CP) usando filtración en gel HPLC. Los sobrenadantes se descongelaron, se filtraron a través de filtros de policarbonato 0,45 µm y se diluyeron (1:50 V/V) con H₂O. Muestras diluidas se cromatografiaron por HPLC usando una columna de Superdex Peptide PE (7.5 x 300 mm) de filtración en gel (Global). El eluyente usado para elución isocrática fue 50 mM de tampón de fosfato de sodio (pH 7,0) con 150 mM de NaCl. El volumen total de eluyente por ciclo fue 26 ml y la velocidad de flujo fue 0,4 ml/min. Perfiles de elución se registraron a 214 nm y el área total bajo los perfiles se determinó por integración. Para estimar contenido de proteína de áreas integradas, una curva de calibración (R²=0,9993) se realizó de una serie de dilución de una muestra de maíz-SBM de referencia digerida *in vitro* con contenido de proteína conocido. La determinación de proteína en esta muestra de referencia se llevo a cabo usando el método Kjeldahl (*determination of % nitrogen; A.O.A.C. (1984) Official Methods of Analysis 14th ed., Washington DC*).

[0265] El contenido de proteína digerida se estimó integrando la cromatografía de área correspondiente a péptidos y aminoácidos con una masa molecular de 1500 Dalton o menos (Savoie,L.; Gauthier,S.F. *Dialysis Cell For The In-vitro Measurement Of Protein Digestibility. J. Food Sci. 1986, 51, 494-498*; Babinszky,L.; Van,D.M.J.M.; Boer,H.; Den,H.L.A. *An In-vitro Method for Prediction of The Digestible Crude Protein Content in Pig Feeds. J. Sci. Food Agr. 1990, 50, 173-178*; Boisen,S.; Eggum,B.O. *Critical Evaluation of In-vitro Methods for Estimating Digestibility in Simple-Stomach Animals. Nutrition Research Reviews 1991, 4, 141-162*). Para determinar la línea divisoria de 1500 dalton, la columna de filtración de gel se calibró usando citocromo C (Boehringer, Alemania), aprotinina, gastrina I y sustancia P (Sigma Aldrich, EEUU), como estándares de masa molecular.

Resultados

[0266] Los resultados mostrados en la tabla 7 de debajo indican que la proteasa L2a, como proteasa 10, significativamente aumentó el nivel de proteína digerible y soluble relativamente a la de blanco. Además, la proteasa L2a aparece por lo menos mejorar numéricamente el nivel de proteína digerible en comparación con la proteasa conocida 10.

45 Tabla 7: Proteína digerido y solubilizada cruda

Enzima	N	En relación a blanco					
		%digestible CP		CV%	%soluble CP		CV%
Blanco	10	100,0	a	5,5	100,0	a	4,4
Proteasa <u>L2a</u>	3	1161	b	0,7	107,2	b	1,1
Proteasa 10	5	112,1	b	1,0	110,2	b	0,6

Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas (ANOVA de 1-vía, prueba Tukey-Krame, P<0,05). SD = desviación típica. %CV = coeficiente de varianza = (SD/medio valor) x 100%

Ejemplo 9: Alimento para animales y aditivos de alimento

[0267] Un aditivo de alimento comprendiendo proteasa L2a de la invención, en forma de una premezcla de vitaminas y minerales, está compuesto como se muestra en la tabla 8 de debajo. Las vitaminas y los carotenoides están disponibles comercialmente de DSM Nutritional Products. Todas las cantidades están en g/kg.

Tabla 8: Composición premezcla

Vitamina A	ROVIMIX A 500	4,00
Vitamina D3	ROVIMIX D3 500	1,00
Vitamina E	ROVIMIX E 50 Ads	8,00
Vitamina B2	ROVIMIX B2 80-SD	1,0
	CAROPHYLL Amarillo	10,0
	Cloruro de colina 50%, min.	300,0
Minerales	Óxido Mn	60,0
	Óxido Zn	12,0
	Monohidrato de sulfato Fe	20,0
	Óxido Cu	2,0
	Sulfato Co	0,2
Enzima	Proteasa L2a (proteína enzimática)	10,0
	Harinas de trigos	571,8

5 [0268] La premezcla de la tabla 8 se incluye en una dieta para estratos con una composición como se muestra en la tabla 9 de debajo. La cantidad de cada ingrediente se indica en % (p/p). La concentración en la dieta de la proteasa L2a es 100 mg de proteína de enzima proteasa por kg de la dieta.

Tabla 9: Dieta para estratos

Maíz	55,00
Trigo	10,00
Avena	7,50
Soja	20,00
Piedra caliza	7,50
Premezcla de la tabla 8	1,00

LISTADO DE SECUENCIAS

10

[0269]

<110> Novozymes A/S

15

<120> Proteasas

<130> 10644-204-WO

20

<160> 27

<170> Versión de patentIn 3.2

<210> 1

<211> 1146

25

<212> ADN

213> Nocardiosis dassonvillei subesp. dassonvillei DSM 43235

<220>

<221> CDS

30

<222> (1)..(1143)

<220>

<221> sig_peptide
<222> (1)..(87)

5 <220>
<221> mat_peptide
<222> (568)..(1143)

<400> 1

ES 2 545 494 T3

	atg cga ccc tcc ccc gct atc tcc gct atc ggc acc ggc gca ctc	45
	Met Arg Pro Ser Pro Ala Ile Ser Ala Ile Gly Thr Gly Ala Leu	-185 -180 -175
5	gcg ttc ggt ctg gcg ttc tcc gtg acg ccg ggc gcc agt gcg gcg	90
	Ala Phe Gly Leu Ala Phe Ser Val Thr Pro Gly Ala Ser Ala Ala	-170 -165 -160
10	acc gta ccg gcc gag cca gcg agc gag gcc cag acg atg atg gaa	135
	Thr Val Pro Ala Glu Pro Ala Ser Glu Ala Gln Thr Met Met Glu	-155 -150 -145
15	gcg ctg cag aga gac ctc ggc ctc acc ccg ctc ggg gcc gag gag	180
	Ala Leu Gln Arg Asp Leu Gly Leu Thr Pro Leu Gly Ala Glu Glu	-140 -135 -130
20	ctg ctc tcg gcg cag gaa gag gcg atc gag acc gac gcc gag gcc	225
	Leu Leu Ser Ala Gln Glu Glu Ala Ile Glu Thr Asp Ala Glu Ala	-125 -120 -115
25	acc gag gcc gcg gga gcg tcc tac ggc ggc tcc ctg ttc gac acc	270
	Thr Glu Ala Ala Gly Ala Ser Tyr Gly Gly Ser Leu Phe Asp Thr	-110 -105 -100
30	gag acc ctc cag ctc acc gtg ctg gtg acc gac gcc tcg gcc gtc gag	318
	Glu Thr Leu Gln Leu Thr Val Leu Val Thr Asp Ala Ser Ala Val Glu	-95 -90 -85
35	gcg gtg gag gcc acc ggc gcc gag gcc acc gtg gtc tca cac ggc gca	366
	Ala Val Glu Ala Thr Gly Ala Glu Ala Thr Val Val Ser His Gly Ala	-80 -75 -70
40	gag ggc ctg gcc gag gtg gtc gac gcg ctc gac gag acc ggc ggc cgg	414
	Glu Gly Leu Ala Glu Val Val Asp Ala Leu Asp Glu Thr Gly Gly Arg	-65 -60 -55
45	gaa ggg gtc gtc ggc tgg tac ccg gac gtg gag agc gac acc gtc gtg	462
	Glu Gly Val Val Gly Trp Tyr Pro Asp Val Glu Ser Asp Thr Val Val	

ES 2 545 494 T3

	-50					-45						-40					
	gtc	cag	gtc	gcc	gag	ggc	gcc	agc	gcc	gac	ggc	ctc	atc	gag	gcc	gcg	510
	Val	Gln	Val	Ala	Glu	Gly	Ala	Ser	Ala	Asp	Gly	Leu	Ile	Glu	Ala	Ala	
	-35					-30					-25					-20	
5	ggc	gtg	gac	ccc	tcc	gcc	gtc	cgg	gtg	gag	gag	acc	agt	gag	act	ccg	558
	Gly	Val	Asp	Pro	Ser	Ala	Val	Arg	Val	Glu	Glu	Thr	Ser	Glu	Thr	Pro	
					-15					-10					-5		
10	cgc	ctg	tac	gcc	gac	atc	gtc	ggc	ggc	gag	gcg	tac	tac	atg	ggc	ggc	606
	Arg	Leu	Tyr	Ala	Asp	Ile	Val	Gly	Gly	Glu	Ala	Tyr	Tyr	Met	Gly	Gly	
			-1	1				5				10					
15	gga	cgc	tgc	tcc	gtc	ggg	ttc	gcc	gtg	acc	gac	ggc	tcc	ggc	gcg	ggc	654
	Gly	Arg	Cys	Ser	Val	Gly	Phe	Ala	Val	Thr	Asp	Gly	Ser	Gly	Ala	Gly	
		15					20					25					
20	ggc	ttc	gtg	acg	gcg	ggc	cac	tgc	ggc	acc	gtc	ggc	acc	ggc	gcc	gag	702
	Gly	Phe	Val	Thr	Ala	Gly	His	Cys	Gly	Thr	Val	Gly	Thr	Gly	Ala	Glu	
	30					35					40					45	
25	agc	tcc	gac	ggc	agc	ggc	tcc	gga	acc	ttc	cag	gag	tcc	gtc	ttc	ccg	750
	Ser	Ser	Asp	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Phe	Gln	Glu	Ser	Val	Phe	Pro	
					50					55					60		
30	ggc	agc	gac	ggc	gcc	ttc	gtc	gcg	gcc	acc	tcc	aac	tgg	aac	gtg	acc	798
	Gly	Ser	Asp	Gly	Ala	Phe	Val	Ala	Ala	Thr	Ser	Asn	Trp	Asn	Val	Thr	
				65					70					75			
35	aac	ctg	gtc	agc	cgg	tac	gac	tcc	ggc	agc	ccc	cag	gcg	gtg	tcc	ggt	846
	Asn	Leu	Val	Ser	Arg	Tyr	Asp	Ser	Gly	Ser	Pro	Gln	Ala	Val	Ser	Gly	
			80					85				90					
40	tcc	agc	cag	gcc	ccg	gag	ggc	tcc	ggc	gtg	tgc	cgc	tcc	ggc	tcc	acc	894
	Ser	Ser	Gln	Ala	Pro	Glu	Gly	Ser	Ala	Val	Cys	Arg	Ser	Gly	Ser	Thr	
		95					100					105					
45	acc	ggc	tgg	cac	tgc	ggg	acc	atc	gag	gcc	cgc	ggc	cag	acg	gtg	aac	942
	Thr	Gly	Trp	His	Cys	Gly	Thr	Ile	Glu	Ala	Arg	Gly	Gln	Thr	Val	Asn	
	110					115					120					125	
50	tac	ccg	cag	ggc	acg	gtc	cag	gac	ctg	acc	cgg	acg	gac	gtg	tgc	gcc	990
	Tyr	Pro	Gln	Gly	Thr	Val	Gln	Asp	Leu	Thr	Arg	Thr	Asp	Val	Cys	Ala	
					130					135					140		
55	gag	ccc	ggt	gac	tcc	ggc	ggc	tcc	ttc	atc	gcc	ggt	tcc	cag	gcc	cag	1038
	Glu	Pro	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Ser	Phe	Ile	Ala	Gly	Ser	Gln	Ala	Gln	
				145					150					155			
60	ggc	gtc	acc	tcc	ggc	ggc	tcc	ggc	aac	tgc	acc	tcc	ggc	ggc	acg	acc	1086
	Gly	Val	Thr	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Asn	Cys	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Thr	
			160					165					170				
65	tac	tac	cag	gag	gtc	act	ccc	ctg	ctg	agc	agc	tgg	ggg	ctg	tcc	ctg	1134
	Tyr	Tyr	Gln	Glu	Val	Thr	Pro	Leu	Leu	Ser	Ser	Trp	Gly	Leu	Ser	Leu	
			175				180					185					
70	gtg	acc	ggt	tag													1146
	Val	Thr	Gly														
	190																

<210> 2
 <211> 381
 <212> PRT
 <213> Nocardiosis dassonvillei subesp. dassonvillei DSM 43235

<400> 2

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

Asn Leu Val Ser Arg Tyr Asp Ser Gly Ser Pro Gln Ala Val Ser Gly
 80 85 90
 5 ser Ser Gln Ala Pro Glu Gly Ser Ala Val Cys Arg Ser Gly Ser Thr
 95 100 105
 10 Thr Gly Trp His Cys Gly Thr Ile Glu Ala Arg Gly Gln Thr Val Asn
 110 115 120 125
 15 Tyr Pro Gln Gly Thr Val Gln Asp Leu Thr Arg Thr Asp Val Cys Ala
 130 135 140
 20 Glu Pro Gly Asp Ser Gly Gly Ser Phe Ile Ala Gly Ser Gln Ala Gln
 145 150 155
 25 Gly Val Thr Ser Gly Gly Ser Gly Asn Cys Thr Ser Gly Gly Thr Thr
 160 165 170
 30 Tyr Tyr Gln Glu Val Thr Pro Leu Leu Ser Ser Trp Gly Leu Ser Leu
 175 180 185
 Val Thr Gly
 190

<210> 3
 <211> 1152 <212> ADN
 <213> Nocardiosis prasina DSM 15649

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1149)

<220>
 <221> sig_peptido
 <222> (1)..(87)

<220>
 <221> mat_peptido
 <222> (574)..(1149)

<400> 3

ES 2 545 494 T3

	atg	cga	ccc	tcc	ccc	gtc	atc	tcc	gcg	atc	ggc	acg	gga	gca	ctg	45
	Met	Arg	Pro	Ser	Pro	Val	Ile	Ser	Ala	Ile	Gly	Thr	Gly	Ala	Leu	
		-190					-185					-180				
5	gcc	ttc	ggg	ctc	gcg	ctc	tcg	gtc	gcg	ccc	ggc	gcc	tcc	gcc	gtc	90
	Ala	Phe	Gly	Leu	Ala	Leu	Ser	Val	Ala	Pro	Gly	Ala	ser	Ala	Val	
		-175					-170					-165				
10	acc	gca	ccc	acc	gag	ccc	gcg	ccc	cag	ggc	gag	gcg	gcc	acc	atg	135
	Thr	Ala	Pro	Thr	Glu	Pro	Ala	Pro	Gln	Gly	Glu	Ala	Ala	Thr	Met	
		-160					-155					-150				
15	cag	gaa	gcg	ctt	gag	agg	gac	ttc	ggc	ctc	acc	ccg	ttc	gag	gcc	180
	Gln	Glu	Ala	Leu	Glu	Arg	Asp	Phe	Gly	Leu	Thr	Pro	Phe	Glu	Ala	
		-145					-140					-135				
20	gaa	gac	ctg	ctc	gaa	gcc	cag	aat	gac	gct	ctc	ggg	atc	gac	acg	225
	Glu	Asp	Leu	Leu	Glu	Ala	Gln	Asn	Asp	Ala	Leu	Gly	Ile	Asp	Thr	
25																
30																
35																
40																
45																
50																
55																
60																

ES 2 545 494 T3

```

gcc cag ggc atg acc tcg ggc ggc tcc ggc aac tgc tcc tcc ggt ggt      1086
Ala Gln Gly Met Thr Ser Gly Gly Ser Gly Asn Cys Ser Ser Gly Gly
                    160                    165                    170

5  acc acg tac tac cag gag gtc ggc ccg gcg ctg agc acc tgg aac ctc      1134
Thr Thr Tyr Tyr Gln Glu Val Gly Pro Ala Leu Ser Thr Trp Asn Leu
                    175                    180                    185

10  agc ctc gtc acc agc tag      1152
Ser Leu Val Thr Ser
                    190

15  <210> 4
    <211> 383
    <212> PRT
    <213> Nocardiosis prasina DSM 15649

20  <400> 4

Met Arg Pro Ser Pro Val Ile Ser Ala Ile Gly Thr Gly Ala Leu
   -190                    -185                    -180

25  Ala Phe Gly Leu Ala Leu Ser Val Ala Pro Gly Ala Ser Ala Val
   -175                    -170                    -165

30  Thr Ala Pro Thr Glu Pro Ala Pro Gln Gly Glu Ala Ala Thr Met
   -160                    -155                    -150

35  Gln Glu Ala Leu Glu Arg Asp Phe Gly Leu Thr Pro Phe Glu Ala
   -145                    -140                    -135

40  Glu Asp Leu Leu Glu Ala Gln Asn Asp Ala Leu Gly Ile Asp Thr
   -130                    -125                    -120

45  Ala Ala Ala Lys Ala Ala Gly Asp Ala Tyr Ala Gly Ser Val Phe
   -115                    -110                    -105

50  Asp Thr Asp Thr Leu Glu Leu Thr Val Leu Leu Thr Asp Ala Gly Ala
   -100                    -95                    -90

55  Val Ser Asp Val Glu Ala Thr Gly Ala Gly Thr Glu Leu Val Ser Tyr
   -85                    -80                    -75                    -70

60  Gly Thr Glu Gly Leu Ala Glu Ile Met Asp Glu Leu Asp Ala Ala Gly
   -65                    -60                    -55

65  Ala Gln Pro Gly Val Val Gly Trp Tyr Pro Asp Leu Ala Gly Asp Thr
   -50                    -45                    -40

70  Val Val Ile Glu Ala Thr Asp Thr Ser Glu Ala Gln Ser Phe Val Glu
   -35                    -30                    -25

75  Ala Ala Gly Val Asp Ser Ser Ala Val Gln Val Glu Gln Thr Asp Glu
   -20                    -15                    -10

```

ES 2 545 494 T3

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

45
 <210> 5
 <211> 1152
 <212> ADN
 50 <213> Nocardiosis prasina DSM 14010
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1149)
 55 <220>
 <221> six_peptidos
 <222> (1)..(87)
 60 <220>
 <221> mat_peptido
 <222> (574)..(1149)
 <400> 5

ES 2 545 494 T3

	atg cga ccc tcc ccc gtc atc tcc gcg atc ggc acg gga gcg ctg	45
	Met Arg Pro Ser Pro Val Ile Ser Ala Ile Gly Thr Gly Ala Leu	
	-190 -185 -180	
5	gcc ttc ggg ctc gcg ctc tcg gtc gct ccc ggc gcc tcc gcc gtg	90
	Ala Phe Gly Leu Ala Leu Ser Val Ala Pro Gly Ala Ser Ala Val	
	-175 -170 -165	
10	acc gcc ccc gcc gag ccc tcg ccc cag ggc gag gcg acc acc atg	135
	Thr Ala Pro Ala Glu Pro Ser Pro Gln Gly Glu Ala Thr Thr Met	
	-160 -155 -150	
15	cag gaa gcg ctt gag agg gac ttc ggc ctc acc ccg ttc gag gcc	180
	Gln Glu Ala Leu Glu Arg Asp Phe Gly Leu Thr Pro Phe Glu Ala	
	-145 -140 -135	
20	gac gac ctg ctc gaa gcc cag aag gag gcc ctc ggg atc gac acg	225
	Asp Asp Leu Leu Glu Ala Gln Lys Glu Ala Leu Leu Ile Asp Thr	
	-130 -125 -120	
25	gcc gcc gcc gag gcc gcc ggc gac gcc tac gcg ggc tcc gtg ttc	270
	Ala Ala Ala Glu Ala Ala Gly Asp Ala Tyr Ala Gly Ser Val Phe	
	-115 -110 -105	
30	gac acc gac acc ctg gaa ctg acc gtc ctg ctc acg gac ggc ggc ccg	318
	Asp Thr Asp Thr Leu Glu Leu Thr Val Leu Leu Thr Asp Gly Gly Pro	
	-100 -95 -90	
35	gcc tcg gac gtc gag gcc gcc ggc gcc gag acc tcg gtg gtc tcc cac	366
	Ala Ser Asp Val Glu Ala Ala Gly Ala Glu Thr Ser Val Val Ser His	
	-85 -80 -75 -70	
40	ggc acc gac ggc ctg gcg gcg atc atg gac gag ctc gac gcc gtc ggc	414
	Gly Thr Asp Gly Leu Ala Ala Ile Met Asp Glu Leu Asp Ala Val Gly	
	-65 -60 -55	
45	gcc cag ccg ggt gtc gtc ggc tgg tac ccc gac ctc gcc agc gac acg	462
	Ala Gln Pro Gly Val Val Gly Trp Tyr Pro Asp Leu Ala Ser Asp Thr	
	-50 -45 -40	
50	gtg gtc gtc gag gcc acc gac gcg tcc gac gcc cag ggc ttc atc gag	510
	Val Val Val Glu Ala Thr Asp Ala Ser Asp Ala Gln Gly Phe Ile Glu	
	-35 -30 -25	
55	gcc gcc ggc gtg gac tcc tcc gcc gtc cag gtg gag gag acc gac gag	558
	Ala Ala Gly Val Asp Ser Ser Ala Val Gln Val Glu Glu Thr Asp Glu	
	-20 -15 -10	
60	tcg ccc gag ctg tac gcc gac atc gtc ggc ggc gac gcc tac tac atg	606
	Ser Pro Glu Leu Tyr Ala Asp Ile Val Gly Gly Asp Ala Tyr Tyr Met	
	-5 -1 1 5 10	
65	ggc ggc gga cgc tgc tcg gtg ggc ttc gcg gcc acc gac agc gcg ggc	654
	Gly Gly Gly Arg Cys Ser Val Gly Phe Ala Ala Thr Asp Ser Ala Gly	
	15 20 25	
70	aac gac gga ttc gtg acg gcc ggc cac tgc ggc acc gtc ggc acc tcc	702
	Asn Asp Gly Phe Val Thr Ala Gly His Cys Gly Thr Val Gly Thr Ser	
	30 35 40	
75	gcc gac agc gag gac ggc agc ggc tcc ggt gtg ttc gag gag tcg atc	750
	Ala Asp Ser Glu Asp Gly Ser Gly Ser Gly Val Phe Glu Glu Ser Ile	
	45 50 55	
80	ttc ccg ggc aac gac gcc gcc ttc gtc cgg tcc acg tcc aac tgg acc	798
	Phe Pro Gly Asn Asp Ala Ala Phe Val Arg Ser Thr Ser Asn Trp Thr	
	60 65 70 75	

65

ES 2 545 494 T3

5 gtc acc aac ctg gtc aac atg tac agc tcc ggc ggc acc cag tcc gtc 846
 Val Thr Asn Leu Val Asn Met Tyr Ser ser Gly Gly Thr Gln ser Val
 80 85 90
 5 ggc ggc tcc acc cag gcc ccg gtc ggc gcg gcc gtg tgc cgc tcc ggt 894
 Gly Gly Ser Thr Gln Ala Pro Val Gly Ala Ala Val Cys Arg Ser Gly
 95 100 105
 10 tcc acc acg ggc tgg cac tgc ggc acc atc gag gcc cga ggc cag tcg 942
 Ser Thr Thr Gly Trp His Cys Gly Thr Ile Glu Ala Arg Gly Gln Ser
 110 115 120
 15 gtg agc tac ccg gag gcc acc gtc aac gac atg acc cgg acc aac gtg 990
 Val Ser Tyr Pro Glu Gly Thr Val Asn Asp Met Thr Arg Thr Asn Val
 125 130 135
 20 tgc gcc gag ccc gcc gac tcc ggc ggt tcg ttc atc tcc gac gac cag 1038
 Cys Ala Glu Pro Gly Asp Ser Gly Gly ser Phe Ile Ser Asp Asp Gln
 140 145 150 155
 20 gcc cag ggc atg acc tcg gcc gcc tcc ggc aac tgc acc tcc ggt ggt 1086
 Ala Gln Gly Met Thr Ser Gly Gly Ser Gly Asn Cys Thr Ser Gly Gly
 160 165 170
 25 acg acg tac tac cag gag gtc gcc ccg gcg ctg agc acc tgg aac ctc 1134
 Thr Thr Tyr Tyr Gln Glu Val Gly Pro Ala Leu Ser Thr Trp Asn Leu
 175 180 185
 30 agc ctc gtc acg agc tag 1152
 Ser Leu Val Thr Ser
 190

<210> 6
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> Nocardiosis prasina DSM 14010

<400> 6
 40 Met Arg Pro Ser Pro Val Ile Ser Ala Ile Gly Thr Gly Ala Leu
 -190 -185 -180
 45 Ala Phe Gly Leu Ala Leu Ser Val Ala Pro Gly Ala ser Ala Val
 -175 -170 -165
 50 Thr Ala Pro Ala Glu Pro Ser Pro Gln Gly Glu Ala Thr Thr Met
 -160 -155 -150
 55 Gln Glu Ala Leu Glu Arg Asp Phe Gly Leu Thr Pro Phe Glu Ala
 -145 -140 -135
 60 Asp Asp Leu Leu Glu Ala Gln Lys Glu Ala Leu Gly Ile Asp Thr
 -130 -125 -120
 65 Ala Ala Ala Glu Ala Ala Gly Asp Ala Tyr Ala Gly ser Val Phe
 -115 -110 -105
 Asp Thr Asp Thr Leu Glu Leu Thr Val Leu Leu Thr Asp Gly Gly Pro
 -100 -95 -90

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

ES 2 545 494 T3

<210> 7
<211> 1155
<212> ADN
5 <213> Nocardiosis sp. DSM 16424

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1152)
10

<220>
<221> sig_peptido
<222> (1)..(87)

15 <220>
<221> mat_peptido
<222> (586)..(1152)

20 <400> 7

ES 2 545 494 T3

	atg	aga	ccc	tcc	acc	atc	gcc	tcc	gcc	gtc	ggc	aca	gga	gca	ctg	45	
	Met	Arg	Pro	Ser	Thr	Ile	Ala	Ser	Ala	Val	Gly	Thr	Gly	Ala	Leu		
	-195					-190					-185						
5	gcc	ttc	ggt	ctg	gca	ctg	tcc	atg	gcc	ccc	gga	gcc	ctc	gcg	gcg	90	
	Ala	Phe	Gly	Leu	Ala	Leu	Ser	Met	Ala	Pro	Gly	Ala	Leu	Ala	Ala		
	-180					-175					-170						
10	ccc	ggc	ccc	gtc	ccc	cag	acc	ccc	gtc	gcc	gac	gac	agc	gcc	gcc	135	
	Pro	Gly	Pro	Val	Pro	Gln	Thr	Pro	Val	Ala	Asp	Asp	Ser	Ala	Ala		
	-165					-160					-155						
15	agc	atg	acc	gaa	gcg	ctc	aag	cgt	gac	ctc	aac	ctc	tcc	tcg	gcc	180	
	Ser	Met	Thr	Glu	Ala	Leu	Lys	Arg	Asp	Leu	Asn	Leu	Ser	Ser	Ala		
	-150					-145					-140						
20	gag	gcc	gag	gag	ctg	ctc	tcg	gcg	cag	gaa	gcc	gcg	atc	gag	acc	225	
	Glu	Ala	Glu	Glu	Leu	Leu	Ser	Ala	Gln	Glu	Ala	Ala	Ile	Glu	Thr		
	-135					-130					-125						
25	gac	gcc	gag	gcc	gcc	gag	gcc	gcg	gga	gag	gcc	tac	ggc	ggc	tcc	270	
	Asp	Ala	Glu	Ala	Ala	Glu	Ala	Ala	Gly	Glu	Ala	Tyr	Gly	Gly	Ser		
	-120					-115					-110						
30	ctg	ttc	gac	acc	gaa	acc	ctc	gaa	ctc	acc	gtg	ctg	gtg	acc	gac	acc	318
	Leu	Phe	Asp	Thr	Glu	Thr	Leu	Glu	Leu	Thr	Val	Leu	Val	Thr	Asp	Thr	
	-105					-100					-95					-90	
35	acg	gcc	gtc	gac	gcg	gtc	gag	gcc	acc	gga	gcc	gag	gcc	acc	gtg	gtc	366
	Thr	Ala	Val	Asp	Ala	Val	Glu	Ala	Thr	Gly	Ala	Glu	Ala	Thr	Val	Val	
					-85					-80					-75		
40	acc	cac	ggc	acc	gac	ggc	ctg	gcc	gag	gtc	gtg	gag	gac	ctc	aac	agc	414
	Thr	His	Gly	Thr	Asp	Gly	Leu	Ala	Glu	Val	Val	Glu	Asp	Leu	Asn	Ser	
				-70					-65					-60			
45	gcc	gac	gcc	ccg	gcg	ggc	gtc	ctc	ggc	tgg	tac	ccc	gac	atg	gag	agc	462
	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Gly	Val	Leu	Gly	Trp	Tyr	Pro	Asp	Met	Glu	Ser	
			-55					-50					-45				
50	gac	acc	gtg	gtg	gtc	gag	gtg	ctg	gag	ggc	tcc	gac	gcc	gac	gtc	gcc	510
	Asp	Thr	Val	Val	Val	Glu	Val	Leu	Glu	Gly	Ser	Asp	Ala	Asp	Val	Ala	
	-40					-35						-30					
55	gcc	ctg	ctc	gcc	gac	gcc	ggc	gtg	gac	gcc	tcc	gcc	gtc	cgg	gtg	gag	558
	Ala	Leu	Leu	Ala	Asp	Ala	Gly	Val	Asp	Ala	Ser	Ala	Val	Arg	Val	Glu	
	-25					-20					-15					-10	

50
55
60
65

	gag gcg gag gag gtc ccg cag gtc tac gcc aac atc atc ggc ggc ctg	606
	Glu Ala Glu Glu Val Pro Gln Val Tyr Ala Asn Ile Ile Gly Gly Leu	
	-5 -1 1 5	
5	gcc tac acc atg ggc gga cgc tgc tcc gtc ggc ttc gcg gcg acc aac	654
	Ala Tyr Thr Met Gly Gly Arg Cys Ser Val Gly Phe Ala Ala Thr Asn	
	10	
10	agc gcc gga cag ccc ggt ttc gtg acg gcg ggc cac tgc ggc acc gtc	702
	Ser Ala Gly Gln Pro Gly Phe Val Thr Ala Gly His Cys Gly Thr Val	
	25 30 35	
15	ggc acc gcc gtg acc atc ggc gac ggc cgc ggc gtc ttc gag cgc tcg	750
	Gly Thr Ala Val Thr Ile Gly Asp Gly Arg Gly Val Phe Glu Arg Ser	
	40 45 50 55	
20	gtc ttc ccc ggc aac gac gcc gcc ttc gtc cgc ggc acc tcc aac ttc	798
	Val Phe Pro Gly Asn Asp Ala Ala Phe Val Arg Gly Thr Ser Asn Phe	
	60 65 70	
25	acc ctg acc aac ctg gtc tcc cgc tac aac tcc ggc ggc cac cag gcg	846
	Thr Leu Thr Asn Leu Val Ser Arg Tyr Asn Ser Gly Gly His Gln Ala	
	75 80 85	
30	gtg acc ggc acc agc cag gcc ccg gcc ggc tgc ggc acc atc cag gcc cgc aac cag	894
	Val Thr Gly Thr Ser Gln Ala Pro Ala Gly Ser Ala Val Cys Arg Ser	
	90 95 100	
35	ggc tcc acc acc ggc tgg cac tgc ggc acc atc cag gcc cgc aac cag	942
	Gly Ser Thr Thr Gly Trp His Cys Gly Thr Ile Gln Ala Arg Asn Gln	
	105 110 115	
40	acc gtg cgc tac ccg cag gcc acc gtc aac gcg ctc acc cgc acc aac	990
	Thr Val Arg Tyr Pro Gln Gly Thr Val Asn Ala Leu Thr Arg Thr Asn	
	120 125 130 135	
45	gtg tgc gcc gag ccc ggt gac tcc ggc ggc tgc ttc atc tcc ggc tcg	1038
	Val Cys Ala Glu Pro Gly Asp Ser Gly Gly Ser Phe Ile Ser Gly Ser	
	140 145 150	
50	cag gcc cag ggc gtc acc tcc ggc ggc tcc ggc aac tgc tcc ttc ggc	1086
	Gln Ala Gln Gly Val Thr Ser Gly Gly Ser Gly Asn Cys Ser Phe Gly	
	155 160 165	
55	ggc acg acc tac tac cag gag gtc gcc ccg atg atc aac tcc tgg ggc	1134
	Gly Thr Thr Tyr Tyr Gln Glu Val Ala Pro Met Ile Asn Ser Trp Gly	
	170 175 180	
60	gtt cgc atc cgc acc agc tga	1155
	Val Arg Ile Arg Thr Ser	
	185	
50	<210> 8	
	<211> 384	
	<212> PRT	
	<213> Nocardopsis sp. DSM 16424	
	<400> 8	
55	Met Arg Pro Ser Thr Ile Ala ser Ala val Gly Thr Gly Ala Leu	
	-195 -190 -185	
	Ala Phe Gly Leu Ala Leu Ser Met Ala Pro Gly Ala Leu Ala Ala	
	-180 -175 -170	
60		

ES 2 545 494 T3

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

ES 2 545 494 T3

	105					110								115		
5	Thr	Val	Arg	Tyr	Pro	Gln	Gly	Thr	Val	Asn	Ala	Leu	Thr	Arg	Thr	Asn
	120					125					130					135
	Val	Cys	Ala	Glu	Pro	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Ser	Phe	Ile	Ser	Gly	Ser
					140					145					150	
10	Gln	Ala	Gln	Gly	Val	Thr	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Asn	Cys	Ser	Phe	Gly
				155					160					165		
15	Gly	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Gln	Glu	Val	Ala	Pro	Met	Ile	Asn	Ser	Trp	Gly
			170					175					180			
20	Val	Arg	Ile	Arg	Thr	Ser										
	185															

<210> 9

<211> 1152

<212> ADN

25 <213> Nocardiosis alkaliphila DSM 44657

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1149)

30

<220>

<221> sig_péptido

<222> (1)..(87)

35

<220>

<221> mat_péptido

<222> (586)..(1149)

40

<400> 9

45

50

55

60

65

ES 2 545 494 T3

	atg	cga	ccc	tcc	ccc	gtt	gtc	tcc	gcc	ata	ggc	aca	gga	gcc	ttg	45
	Met	Arg	Pro	Ser	Pro	Val	Val	Ser	Ala	Ile	Gly	Thr	Gly	Ala	Leu	
	-195					-190					-185					
5	gcc	ttc	ggc	ctg	gct	ctg	ggc	act	tcc	ccc	ggc	gcc	atc	gcc	gcc	90
	Ala	Phe	Gly	Leu	Ala	Leu	Gly	Thr	Ser	Pro	Ala	Ala	Ile	Ala	Ala	
	-180					-175					-170					
10	ccc	gcc	ccc	cag	tcc	ccc	gac	acc	gaa	acg	cag	gcc	gag	gcc	gtc	135
	Pro	Ala	Pro	Gln	Ser	Pro	Asp	Thr	Glu	Thr	Gln	Ala	Glu	Ala	Val	
	-165					-160					-155					
15	acc	atg	gcc	gaa	gcc	ctc	caa	cgc	gat	ctc	ggc	ctg	tcc	tcc	tcc	180
	Thr	Met	Ala	Glu	Ala	Leu	Gln	Arg	Asp	Leu	Gly	Leu	Ser	Ser	Ser	
	-150					-145					-140					
20	gag	gcc	acc	gaa	ctc	ctc	gcc	gca	cag	gcc	gag	gcc	ttc	gag	gtc	225
	Glu	Ala	Thr	Glu	Leu	Leu	Ala	Ala	Gln	Ala	Glu	Ala	Phe	Glu	Val	
	-135					-130					-125					
25	gac	gag	gcc	gcc	acc	gag	gcc	gcc	gcc	gac	gcc	tac	ggc	ggc	tcc	270
	Asp	Glu	Ala	Ala	Thr	Glu	Ala	Ala	Ala	Asp	Ala	Tyr	Gly	Gly	Ser	
	-120					-115					-110					
30	ctc	ttc	gac	acc	gac	agc	ctc	gaa	ctg	acc	gtg	ctg	gtc	acc	gac	agc
	Leu	Phe	Asp	Thr	Asp	Ser	Leu	Glu	Leu	Thr	Val	Leu	Val	Thr	Asp	Ser
	-105					-100					-95					-90

30
35
40
45
50
55
60
65

ES 2 545 494 T3

	gcc	gcc	gtc	gac	gcg	gtc	gag	gcc	acc	ggc	gcc	aag	gcc	gag	gtc	gtc	366
	Ala	Ala	Val	Asp	Ala	Val	Glu	Ala	Thr	Gly	Ala	Lys	Ala	Glu	Val	Val	
					-85					-80					-75		
5	gac	cac	ggg	atc	gag	ggc	ctc	gag	gag	atc	gtc	gac	gaa	ctc	aac	gag	414
	Asp	His	Gly	Ile	Glu	Gly	Leu	Glu	Glu	Ile	Val	Asp	Glu	Leu	Asn	Glu	
				-70					-65					-60			
10	tcc	aac	gcc	aag	tcg	ggc	gtc	gtc	ggg	tgg	tac	ccc	gac	gtg	gcc	ggg	462
	Ser	Asn	Ala	Lys	Ser	Gly	Val	Val	Gly	Trp	Tyr	Pro	Asp	Val	Ala	Gly	
			-55					-50					-45				
15	gac	acg	gtc	gtc	ctg	gag	gtc	atg	gaa	ggc	tcc	gag	gcc	gac	gtg	gac	510
	Asp	Thr	Val	Val	Leu	Glu	Val	Met	Glu	Gly	Ser	Glu	Ala	Asp	Val	Asp	
		-40					-35					-30					
20	gcc	ctg	ctc	gcc	gag	acc	ggg	gtc	gac	gcc	gcc	gac	gtc	acg	gtg	gag	558
	Ala	Leu	Leu	Ala	Glu	Thr	Gly	Val	Asp	Ala	Ala	Asp	Val	Thr	Val	Glu	
	-25					-20				-15						-10	
25	acc	acc	acc	gag	cag	ccc	gag	ctc	tac	gcc	gac	atc	atc	ggg	ggc	ctg	606
	Thr	Thr	Thr	Glu	Gln	Pro	Glu	Leu	Tyr	Ala	Asp	Ile	Ile	Gly	Gly	Leu	
					-5				-1	1				5			
30	gcc	tac	acc	atg	ggc	gga	cgt	tgc	tcg	gtc	ggc	ttc	gcc	gcc	acc	aac	654
	Ala	Tyr	Thr	Met	Gly	Gly	Arg	Cys	Ser	Val	Gly	Phe	Ala	Ala	Thr	Asn	
			10					15					20				
35	tcc	tcc	ggc	cag	ccc	gga	ttc	gtc	acc	gcc	ggc	cac	tgc	ggc	agt	gtc	702
	Ser	Ser	Gly	Gln	Pro	Gly	Phe	Val	Thr	Ala	Gly	His	Cys	Gly	ser	Val	
		25					30					35					
40	ggc	acc	ggc	gtc	acc	atc	ggg	aac	ggc	cgg	ggc	gtc	ttc	gag	cgt	tcc	750
	Gly	Thr	Gly	Val	Thr	Ile	Gly	Asn	Gly	Arg	Gly	Val	Phe	Glu	Arg	Ser	
	40					45				50						55	
45	atc	ttc	ccg	ggc	aac	gac	gcc	gcc	ttc	gtc	cgt	ggc	acg	tcc	aac	ttc	798
	Ile	Phe	Pro	Gly	Asn	Asp	Ala	Ala	Phe	Val	Arg	Gly	Thr	Ser	Asn	Phe	
					60				65						70		
50	acc	ctg	acc	aac	ctg	gtc	agc	cgc	tac	aac	tcc	ggc	ggc	tac	gcc	acc	846
	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Val	Ser	Arg	Tyr	Asn	Ser	Gly	Gly	Tyr	Ala	Thr	
				75					80					85			
55	gtg	tcc	ggg	tcc	tcc	gcg	gcc	ccg	atc	ggc	tcc	cag	gtg	tgc	cgc	tcc	894
	Val	Ser	Gly	Ser	Ser	Ala	Ala	Pro	Ile	Gly	Ser	Gln	Val	Cys	Arg	Ser	
			90					95					100				
60	ggc	tcc	acc	acc	ggc	tgg	cac	tgc	ggc	acc	atc	cag	gcc	cgc	aac	cag	942
	Gly	Ser	Thr	Thr	Gly	Trp	His	Cys	Gly	Thr	Ile	Gln	Ala	Arg	Asn	Gln	
		105					110					115					
65	acc	gtg	cgc	tac	ccg	cag	ggc	acc	gtc	cag	gcc	ctg	acc	cgc	acc	agc	990
	Thr	Val	Arg	Tyr	Pro	Gln	Gly	Thr	Val	Gln	Ala	Leu	Thr	Arg	Thr	Ser	
						125				130						135	
70	gtg	tgc	ggc	gag	ccc	ggg	gac	tcc	ggg	ggg	tcc	ttc	atc	tcc	ggc	agc	1038
	Val	Cys	Ala	Glu	Pro	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Ser	Phe	Ile	Ser	Gly	Ser	
					140				145						150		
75	cag	gcc	cag	ggc	gtc	acc	tcc	ggg	ggc	tcg	ggc	aac	tgc	cgc	acc	ggg	1086
	Gln	Ala	Gln	Gly	Val	Thr	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Asn	Cys	Arg	Thr	Gly	
				155				160					165				
80	ggc	acc	acc	tac	tac	cag	gag	gtc	aac	ccc	atg	ctc	aac	agc	tgg	ggc	1134
	Gly	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Gln	Glu	Val	Asn	Pro	Met	Leu	Asn	Ser	Trp	Gly	
				170				175					180				

ctg cgt ctg cgc acc tga
Leu Arg Leu Arg Thr
185

1152

5 <210> 10
<211> 383
<212> PRT
<213> Nocardiosis alkaliphila DSM 44657

10 <400> 10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Met Arg Pro Ser Pro Val Val Ser Ala Ile Gly Thr Gly Ala Leu
 -195 -190 -185
 5 Ala Phe Gly Leu Ala Leu Gly Thr Ser Pro Ala Ala Ile Ala Ala
 -180 -175 -170
 Pro Ala Pro Gln Ser Pro Asp Thr Glu Thr Gln Ala Glu Ala Val
 -165 -160 -155
 10 Thr Met Ala Glu Ala Leu Gln Arg Asp Leu Gly Leu Ser Ser Ser
 -150 -145 -140
 15 Glu Ala Thr Glu Leu Leu Ala Ala Gln Ala Glu Ala Phe Glu Val
 -135 -130 -125
 20 Asp Glu Ala Ala Thr Glu Ala Ala Ala Asp Ala Tyr Gly Gly Ser
 -120 -115 -110
 25 Leu Phe Asp Thr Asp Ser Leu Glu Leu Thr Val Leu Val Thr Asp Ser
 -105 -100 -95
 Ala Ala Val Asp Ala Val Glu Ala Thr Gly Ala Lys Ala Glu Val Val
 -85 -80 -75
 30 Asp His Gly Ile Glu Gly Leu Glu Glu Ile Val Asp Glu Leu Asn Glu
 -70 -65 -60
 35 Ser Asn Ala Lys Ser Gly Val Val Gly Trp Tyr Pro Asp Val Ala Gly
 -55 -50 -45
 40 Asp Thr Val Val Leu Glu Val Met Glu Gly Ser Glu Ala Asp Val Asp
 -40 -35 -30
 45 Ala Leu Leu Ala Glu Thr Gly Val Asp Ala Ala Asp Val Thr Val Glu
 -25 -20 -15 -10
 Thr Thr Thr Glu Gln Pro Glu Leu Tyr Ala Asp Ile Ile Gly Gly Leu
 -5 -1 1 5
 50 Ala Tyr Thr Met Gly Gly Arg Cys Ser Val Gly Phe Ala Ala Thr Asn
 10 15 20
 55 Ser Ser Gly Gln Pro Gly Phe Val Thr Ala Gly His Cys Gly Ser Val

55

60

65

ES 2 545 494 T3

	atg	cga	ccc	tcc	ccc	gtt	atc	tcc	gcc	cta	gga	acc	ggc	gcc	ctc	45
	Met	Arg	Pro	Ser	Pro	Val	Ile	Ser	Ala	Leu	Gly	Thr	Gly	Ala	Leu	
	-195					-190					-185					

5	gcc	ttc	gga	ctg	gtc	atc	acc	atg	gcc	ccg	ggc	gtg	aac	gcc	gga	90
	Ala	Phe	Gly	Leu	Val	Ile	Thr	Met	Ala	Pro	Gly	Val	Asn	Ala	Gly	
	-180					-175					-170					

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 545 494 T3

	acc	gta	ccc	acc	ccc	cag	gcc	ccc	gtc	ccc	gac	gac	gag	gcc	acc	135	
	Thr	Val	Pro	Thr	Pro	Gln	Ala	Pro	Val	Pro	Asp	Asp	Glu	Ala	Thr		
	-165					-160					-155						
5	acc	atg	ctc	gaa	gcc	atg	gag	agg	gat	ctc	gac	ctc	acc	ccg	ttc	180	
	Thr	Met	Leu	Glu	Ala	Met	Glu	Arg	Asp	Leu	Asp	Leu	Thr	Pro	Phe		
	-150					-145					-140						
10	gag	gcc	gag	gaa	ctc	ttc	gag	gca	cag	gaa	gag	gcc	atc	gac	ctc	225	
	Glu	Ala	Glu	Glu	Leu	Phe	Glu	Ala	Gln	Glu	Glu	Ala	Ile	Asp	Leu		
	-135					-130					-125						
15	gac	gag	gag	gcc	acc	gaa	gcg	gcc	ggt	gcg	gcc	tac	ggc	ggt	tcg	270	
	Asp	Glu	Glu	Ala	Thr	Glu	Ala	Ala	Gly	Ala	Ala	Tyr	Gly	Gly	Ser		
	-120					-115					-110						
20	ctc	ttc	gac	acc	gaa	acc	cac	gaa	ctc	acc	gtc	ctg	gtg	acc	gac	gtc	318
	Leu	Phe	Asp	Thr	Glu	Thr	His	Glu	Leu	Thr	Val	Leu	Val	Thr	Asp	Val	
	-105					-100					-95					-90	
25	gac	gcg	gtc	gag	gcc	gtg	gag	gcc	acc	gga	gcc	gcc	gcc	gag	gtc	gtc	366
	Asp	Ala	Val	Glu	Ala	Val	Glu	Ala	Thr	Gly	Ala	Ala	Ala	Glu	Val	Val	
					-85					-80					-75		
30	tcc	cac	ggc	tcc	gac	ggt	ctg	gcc	gac	atc	gtc	gag	gac	ctc	aac	gcc	414
	Ser	His	Gly	Ser	Asp	Gly	Leu	Ala	Asp	Ile	Val	Glu	Asp	Leu	Asn	Ala	
				-70					-65					-60			
35	acc	gac	gcc	ggc	agc	gag	gtc	gtg	ggc	tgg	tac	ccc	gac	gtc	acc	agc	462
	Thr	Asp	Ala	Gly	Ser	Glu	Val	Val	Gly	Trp	Tyr	Pro	Asp	Val	Thr	Ser	
			-55				-50						-45				
40	gac	agc	gtg	gtc	gtc	gag	gtg	gtc	gag	ggc	tcc	gac	gtc	gac	gtc	gac	510
	Asp	Ser	Val	Val	Val	Glu	Val	Val	Glu	Gly	Ser	Asp	Val	Asp	Val	Asp	
	-40					-35						-30					
45	tcc	atc	gtc	gag	ggc	acg	ggc	gtc	gac	ccg	gcg	gtc	atc	gag	gtc	cag	558
	Ser	Ile	Val	Glu	Gly	Thr	Gly	Val	Asp	Pro	Ala	Val	Ile	Glu	Val	Gln	
	-25					-20					-15					-10	
50	gag	gtc	tcc	gaa	cag	cct	cag	acc	tac	gcc	aac	atc	atc	ggc	ggc	ctg	606
	Glu	Val	Ser	Glu	Gln	Pro	Gln	Thr	Tyr	Ala	Asn	Ile	Ile	Gly	Gly	Leu	
				-5				-1	1					5			
55	gcc	tac	tac	atg	agc	tcg	ggc	ggc	cgc	tgc	tcg	gtc	ggc	ttc	ccc	gcc	654
	Ala	Tyr	Tyr	Met	Ser	Ser	Gly	Gly	Arg	Cys	Ser	Val	Gly	Phe	Pro	Ala	
			10				15						20				
60	acc	aac	agc	tcc	ggc	cag	ccg	ggc	ttc	gtc	acg	gcg	ggc	cac	tgc	ggc	702
	Thr	Asn	Ser	Ser	Gly	Gln	Pro	Gly	Phe	Val	Thr	Ala	Gly	His	Cys	Gly	
		25					30					35					
65	acc	gtc	ggc	acc	ggc	gtc	acc	atc	ggc	aac	ggc	gcg	ggc	acc	ttc	gag	750
	Thr	Val	Gly	Thr	Gly	Val	Thr	Ile	Gly	Asn	Gly	Arg	Gly	Thr	Phe	Glu	
	40					45					50				55		
70	cgc	tcc	gtg	ttc	ccc	ggc	aac	gac	gcc	gcc	ttc	gtc	cga	ggc	acg	tcc	798
	Arg	Ser	Val	Phe	Pro	Gly	Asn	Asp	Ala	Ala	Phe	Val	Arg	Gly	Thr	Ser	
				60						65					70		
75	aac	ttc	acg	ctg	tac	aac	ctc	gtc	tac	cgc	tac	agc	ggc	tac	cag	acc	846
	Asn	Phe	Thr	Leu	Tyr	Asn	Leu	Val	Tyr	Arg	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Gln	Thr	
				75					80						85		
80	gtg	acg	ggc	agc	aac	gcc	gcc	ccg	atc	ggc	tcg	tcc	atc	tgc	cgt	tcc	894
	Val	Thr	Gly	Ser	Asn	Ala	Ala	Pro	Ile	Gly	Ser	Ser	Ile	Cys	Arg	Ser	
			90					95					100				

ES 2 545 494 T3

	ggt tcc acc acc ggc tgg cac tgc ggc acc atc cag gcc cgc aac cag	942
	Gly Ser Thr Thr Gly Trp His Cys Gly Thr Ile Gln Ala Arg Asn Gln	
	105 110 115	
5	acc gtc cgg tac ccg cag ggc acc gtc tac tac ctg acc cgt acc aac	990
	Thr Val Arg Tyr Pro Gln Gly Thr Val Tyr Tyr Leu Thr Arg Thr Asn	
	120 125 130 135	
10	gtg tgc gcc gag ccc ggc gac tcc gga ggc tcc ttc atc tcc gga acg	1038
	Val Cys Ala Glu Pro Gly Asp Ser Gly Gly Ser Phe Ile Ser Gly Thr	
	140 145 150	
15	cag gcc cag ggc atg acc tcc ggc ggc tcc ggc aac tgc agc agc ggt	1086
	Gln Ala Gln Gly Met Thr Ser Gly Gly Ser Gly Asn Cys Ser Ser Gly	
	155 160 165	
20	ggc acc acc ttc tac cag gag gtg gac ccg gtg gag agc gcc tgg ggc	1134
	Gly Thr Thr Phe Tyr Gln Glu Val Asp Pro Val Glu Ser Ala Trp Gly	
	170 175 180	
25	gtg cga ctg cgc acc agc tag	1155
	Val Arg Leu Arg Thr Ser	
	185	
25	<210> 12	
	<211> 384	
	<212> PRT	
	<213> Nocardiosis lucentensis DSM 44048	
30	<400> 12	

ES 2 545 494 T3

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

5 Ala Phe Gly Leu Val Ile Thr Met Ala Pro Gly Val Asn Ala Gly
 -180 -175 -170

10 Thr Val Pro Thr Pro Gln Ala Pro Val Pro Asp Asp Glu Ala Thr
 -165 -160 -155

15 Thr Met Leu Glu Ala Met Glu Arg Asp Leu Asp Leu Thr Pro Phe
 -150 -145 -140

20 Glu Ala Glu Glu Leu Phe Glu Ala Gln Glu Glu Ala Ile Asp Leu
 -135 -130 -125

25 Asp Glu Glu Ala Thr Glu Ala Ala Gly Ala Ala Tyr Gly Gly Ser
 -120 -115 -110

30 Leu Phe Asp Thr Glu Thr His Glu Leu Thr Val Leu Val Thr Asp Val
 -105 -100 -95 -90

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

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

45 Thr Asp Ala Gly Ser Glu Val Val Gly Trp Tyr Pro Asp Val Thr Ser

50

55

60

65

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(81)

5 <400> 13

atgaagaaac cgttggggaa aattgtcgca agcaccgcac tactcatttc tgttgctttt 50
agttcatcga tcgcatcggc t 81

<210> 14
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> sintético

15 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Cebador

<400> 14
 gcttttagt catcgatcg atcggctgcg accgtaccgg ccgagccag 49

20 <210> 15
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> sintético

25 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Cebador

30 <400> 15
 ggagcggatt gaacatgca ttactaacg gtcaccaggg acagcc 46

<210> 16
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> sintético

35 <220>
 <221> misc-feature
 <223> Cebador

<400> 16
 gttcatgat cgcacggct gtcaccgcac ccaccgagcc 40

45 <210> 17
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> sintético

50 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Cebador

<400> 17
 55 ggagcggatt gaacatgca ttagctggtg acgaggctga ggttc 45

<210> 18
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> sintético

60 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Cebador

ES 2 545 494 T3

<400> 18
gttcatcgat cgcacggct gtagccccc cgcggag 38

5 <210> 19
<211> 45
<212> ADN
<213> sintético

10 <220>
<221> misc_feature
<223> Cebador

<400> 19
15 ggagcggatt gaacatgca ttagctgtg acgaggctga ggttc 45

<210> 20
<211> 41
<212> ADN
20 <213> sintético

<220> <221> misc_feature
<223> Cebador

<400> 20
25 gttcatcgat cgcacggct gcgcccggcc cgtcccca g 41

<210> 21
<211> 41
30 <212> ADN
<213> sintético

<220>
<221> misc_feature
35 <223> Cebador

<400> 21
ggagcggatt gaacatgca tcagctgtg cggatgcaa c 41

<210> 22
<211> 37
<212> ADN
40 <213> sintético

<220>
<221> misc_feature
<223> Cebador

<400> 22
50 gttcatcgat cgcacggct gccccggcc cccagtc 37

<210> 23
<211> 44
<212> ADN
55 <213> sintético

<220>
<221> misc_feature
<223> Cebador

<400> 23
60 ggagcggatt gaacatgca ttagtgctg agacgcaggc ccca 44

<210> 24
65 <211> 42
<212> ADN

ES 2 545 494 T3

<213> sintético
<220>
<221> misc-feature
5 <223> Cebador

<400> 24
gttcatcgat cgcacggct ggaaccgtac ccacccccca gg 42

10 <210> 25
<211> 41
<212> ADN
<213> sintético

15 <220>
<221> mis_feature
<223> Cebador

<400> 25
20 ggagcggatt gaacatgca ttagctggtg cgcagtcgca c 41

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
25 <213> Nocardiosis dassonvillei subesp. dassonvillei DSM 43235

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Terminal N
30 <400> 26

Ala Asp Ile Val Gly Gly Glu Ala Tyr
1 5

35 <210> 27
<211> 10
<212> PRT
<213> Nocardiosis sp. DSM 16424

40 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> N_terminal

<400> 27
45

Ala Asn Ile Ile Gly Gly Leu Ala Tyr Thr
1 5 10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polipéptido aislado con actividad de proteasa, que muestra i) una actividad relativa a 15°C y pH 9 de al menos 0,8, ii) una actividad relativa a 25°C y pH 9 de al menos 0,10; y/o una actividad relativa a 37°C y pH de al menos 0,20 donde la actividad se compara con la actividad a óptima temperatura de la misma proteasa; seleccionado del grupo que consiste en:
- 10 (a) un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que tiene un grado de identidad para aminoácidos 1-192 de la SEC ID nº: 4 o aminoácidos 1-192 de la SEC ID nº:6 de al menos un 80%; y
- (b) un fragmento de (a) que tiene actividad de proteasa.
- 15 2. Polipéptido según la reivindicación 1 que comprende cualquiera de las siguientes proteasas:
 (a) aminoácidos 1-192 de la SEC ID nº: 4 o
 (b) aminoácidos 1-192 de la SEC ID nº: 6
- 20 3. Secuencia de ácidos nucleicos aislada comprendiendo una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con actividad de proteasa, y que
 (a) codifica el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2;
 (b) tiene un grado de identidad para nucleótidos 574-1149 de la SEC ID nº: 5 de al menos un 79,3%.
- 25 4. Secuencia de ácidos nucleicos según la reivindicación 3 que comprende cualquiera de las siguientes secuencias de ácido nucleico que codifican proteasa:
 (a) nucleótidos 574-1149 de la SEC ID nº: 3.
 (b) nucleótidos 574-1149 de la SEC ID nº: 5.
- 30 5. Construcción de ácidos nucleicos comprendiendo la secuencia de ácidos nucleicos de cualquiera de las reivindicaciones 3-4 unida operativamente a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un huésped de expresión adecuado.
- 35 6. Vector de expresión recombinante comprendiendo la construcción de ácidos nucleicos según la reivindicación 5.
7. Célula huésped recombinante comprendiendo la construcción de ácidos nucleicos de la reivindicación 5 o el vector según la reivindicación 6.
- 40 8. Planta transgénica, o parte de planta, que ha sido transformada con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, capaz de expresar el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
- 45 9. Método para la producción de un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, el método comprendiendo
 (a) cultivo de una célula huésped recombinante según la reivindicación 7 para producir un sobrenadante comprendiendo el polipéptido; y
 (b) recuperación del polipéptido.
- 50 10. Método para la producción de un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, el método comprendiendo
 (a) cultivo de cualquiera de las cepas siguientes:
 (i) *Nocardiosis prasina* DSM 15649, o
 (ii) *Nocardiosis prasina* DSM 14010;y
 (b) recuperación del polipéptido.
- 55 11. Uso de al menos un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-2
 (i) en alimento para animales;
 (ii) en aditivos de alimento para animales;
 (iii) en la preparación de una composición para uso en el alimento para animales;
 (iv) para mejorar el valor nutritivo de un alimento para animales;
- 60
65

- (v) para aumentar la proteína soluble y/o digerible en el alimento para animales;
 - (vi) para aumentar el grado de hidrólisis de proteínas en dietas para animales;
 - 5 (vii) para el tratamiento de proteínas; y/o
 - (viii) en composiciones de detergente.
- 10 12. Método para mejorar el valor nutritivo de un alimento para animales, donde al menos un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-2 se añade al alimento.
13. Aditivo de alimento comprendiendo
- 15 (a) al menos una proteasa de cualquiera de las reivindicaciones 1-2 y
 - (b) al menos una vitamina liposoluble, y/o
 - (c) al menos una vitamina hidrosoluble, y/o
 - 20 (d) al menos un oligoelemento.
14. Aditivo de alimento según la reivindicación 13, que comprende además amilasa; fitasa; xilanasas; galactanasas; alfa-galactosidasas; proteasa, fosfolipasa; y/o beta-glucanasa.
- 25 15. Alimento para animales con un contenido bruto de proteína de 50 a 800 g/kg y comprendiendo al menos una proteasa de cualquiera de las reivindicaciones 1-2.