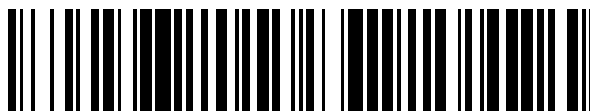


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 558 698**

51 Int. Cl.:

C12N 9/16 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

A23K 1/165 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.01.2010 E 10700262 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.10.2015 EP 2389437**

54 Título: **Polipéptidos con actividad de esterasa y ácidos nucleicos que codifican los mismos**

30 Prioridad:

21.01.2009 EP 09151012

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

08.02.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**PETERSSON, DAN;
WU, WENPING;
TANG, LAN y
LIU, YE**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 558 698 T3

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

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos con actividad de esterasa y ácidos nucleicos que codifican los mismos

5 Referencia a un listado de secuencias

[0001] Esta aplicación contiene un listado de secuencias en forma legible por ordenador.

10 Referencia a un depósito de material biológico

[0002] Esta aplicación contiene una referencia a un depósito de material biológico.
Para información completa ver última página de la descripción.

15 Campo de la invención

[0003] La presente invención se refiere a polipéptidos aislados con actividad de esterasa y secuencias de ácidos nucleicos aisladas que codifican los polipéptidos.

La invención también se refiere a constructos de ácidos nucleicos, vectores, y células huésped que comprenden las secuencias de ácidos nucleicos al igual que a métodos para producir y utilizar los polipéptidos.

20 Antecedentes de la invención

[0004] Polisacáridos de pared celular vegetal constituyen el 90% de la pared celular vegetal y se pueden empalmar en tres grupos: celulosa, hemicelulosa, y pectina.

25 La celulosa representa el constituyente mayor de los polisacáridos de pared celular.

Las hemicelulosas son el segundo constituyente más abundante de paredes celulares vegetales.

El mayor polímero de hemicelulosa es xilano.

La biodegradación del esqueleto de xilano depende de dos clases de enzimas: endoxilanasas y beta-xilosidasas.

30 Las endoxilanasas (EC 3.2.1.8) disocian el esqueleto de xilano en oligosacáridos menores, que pueden ser además degradados a xilosa por beta-xilosidasas (EC 3.2.1.37).

Otras enzimas implicadas en la degradación de xilano incluyen, por ejemplo, acetilxilano esterasa, arabinasa, alfa-glucuronidasa, esterasa, y esterasa de ácido p-cumárico.

35 [0005] WO02/12472 describe una esterasa que es capaz de hidrólisis estereoselectiva de ésteres quirales y de hidrolización de ésteres de ácidos ferúlicos.

[0006] Faulds y Williamson, 1991, J. Gen. Microbiol. 137 2339-2345 describe la purificación y caracterización de esterasa ácida 4-hidroxi-3-metoxi-cinnámico (ferúlica) de *Streptomyces olivochromogenes*. Faulds y Williamson, 1994, Microbiology 140 779-787 describe la purificación y caracterización de una feruloil esterasa de *Aspergillus niger*. Kroon et al., 1996, Biotecnol. Appl. Biochem. 23 255-262 describe la purificación y caracterización de una esterasa nueva inducida por crecimiento de *Aspergillus niger* en la pulpa de remolacha. deVries et al., 1997, Appl. Circundar. Microbiol. 63 4638-4644 revela los genes de esterasa de *Aspergillus niger* y *Aspergillus tubingensis*. Castanares et al., 1992, Enzyme Microbiol. Technol. 14 875-884 describe la purificación y propiedades de una esterasa feruloil/p-coumaroyl del hongo *Pinophilum penicillium*.

45 [0007] Otras feruloil esterases son conocidas, tal como una feruloil esterasa de *Botryotinia fuckeliana* (Uniprot:A6RKM1) que tiene 45% identidad de secuencia a SEC ID n°: 2 y una feruloil esterasa de *Aspergillus niger* (Uniprot: A2QVF5) que tiene 43% identidad de secuencia a SEC ID NO:2.

50 [0008] Revisiones de feruloil esterases pueden ser descubiertas en Beniot et al, 2008, Biotecnol. Letona., 30(3), 387-396; Topakas et al, 2007, Process Biochem., 42(4), 497-509; y Panda et al, 2005, Appl. Microbiol. Biotecnol., 67(2), 160-169.

[0009] La presente invención se refiere a polipéptidos con actividad de esterasa y polinucleótidos que codifican los polipéptidos.

55 Resumen de la invención

[0010] Los inventores han aislado una esterasa de cepa *Myrothecium sp.* que tiene actividad de esterasa.

La esterasa nueva tiene una identidad muy baja inferior a 30% a secuencias de aminoácidos conocidas.

60 Los inventores también aislaron un gen que codifica la esterasa nueva y lo clonaron en una cepa de *E. coli*.

ES 2 558 698 T3

[0011] La presente invención se refiere a polipéptidos aislados con actividad de esterasa seleccionados del grupo consistente en:

1. (a) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos con al menos 75% identidad al polipéptido maduro de SEC ID n°: 2;

5 2. (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que hibridiza bajo al menos condiciones de astringencia alta con (i) la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n°: 1, (ii) la secuencia de ADNc contenida en la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n°: 1, o (iii) una cadena complementaria de longitud completa de (i) o (ii);

10 3. (c) un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 75% identidad a la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n°: 1;

4. (d) una variante de (a); (b) o (c) que comprende una sustitución, delección, y/o inserción del polipéptido maduro de SEC ID n°: 2 donde el número total de sustituciones de aminoácidos, delecciones y/o inserciones del polipéptido maduro de SEC ID n°: 2 es entre 1 y 10;

15 y donde el polipéptido tiene al menos 90% de la actividad de esterasa del polipéptido maduro de SEC ID n°: 2.

[0012] La presente invención también se refiere a polipéptidos de codificación de polinucleótidos aislados de la invención, constructos de ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células huésped recombinantes que comprenden los polinucleótidos, y métodos de producción de un polipéptido con actividad de esterasa.

20 La presente invención se refiere además a planta o partes de planta y animal no-humano transgénicos o productos o elementos de los mismos capaces de expresar el polipéptido de la invención, el uso del polipéptido de la invención en el pienso para animales, métodos para mejorar el valor nutricional de un pienso para animales, y composiciones que comprenden el polipéptido de la invención.

25 Breve descripción de los dibujos

[0013] Actividad de esterasa: el término "actividad de esterasa" se define como actividad de hidrolasa (EC 3,1,1.) que empalma ésteres en un ácido y un alcohol en una reacción química con agua llamada hidrólisis.

30 Para el fin de la presente invención, la actividad de esterasa se determina según el procedimiento de determinación de actividad de esterasa en el sustrato pNPB descrito en el ejemplo 1.

[0014] Es bien conocido en la técnica que la esterasa bajo (EC 3,1,1) se puede elegir de, por ejemplo, feruloil esterasa (EC 3,1,1,73), acetilxilano esterasa (EC 3,1,1,72), metilesterasa de proteína-glutamato (EC 3,1,1,61), carboxilesterasa (EC 3,1,1,1), arilesterasa (EC 3,1,1,2), acetilesterasa (EC 3,1,1,6), colinesterasa (EC 3,1,1,8), esteroil-esterasa (EC 3,1,1,13), esterasa aminoácida alfa (EC 3,1,1,43) etcétera.

[0015] Los polipéptidos de la presente invención tienen al menos 90%, de la forma más preferible al menos 95%, e incluso de la forma más preferible al menos 100% de la actividad de esterasa del polipéptido maduro de SEC ID n°: 2.

[0016] Polipéptido aislado: el término "polipéptido aislado" como se usa aquí se refiere a un polipéptido que es aislado de una fuente.

40 En un aspecto preferido, el polipéptido es al menos 1% puro, preferiblemente al menos 5% puro, de forma más preferible al menos 10% puro, de forma más preferible al menos 20% puro, de forma más preferible al menos 40% puro, de forma más preferible al menos 60%, puro incluso de forma más preferible al menos 80% puro, y de la forma más preferible al menos 90% puro, como determinado por SDS-PAGE.

[0017] Polipéptido sustancialmente puro: el término "polipéptido sustancialmente puro" denota aquí una preparación de polipéptido que contiene como mucho 10%, preferiblemente como mucho 8%, de forma más preferible como mucho 6%, de forma más preferible como mucho 5%, de forma más preferible como mucho 4%, de forma más preferible como mucho 3%, incluso de forma más preferible como mucho 2%, de la forma más preferible como mucho 1%, e incluso de la forma más preferible como mucho 0,5% en peso de otro material de polipéptido con el cual es original o recombinantemente asociado.

50 Es, por lo tanto, preferido que el polipéptido sustancialmente puro sea al menos 92% puro, preferiblemente al menos 94% puro, de forma más preferible al menos 95% puro, de forma más preferible al menos 96% puro, de forma más preferible al menos 96% puro, de forma más preferible al menos 97% puro, de forma más preferible al menos 98% puro, incluso de forma más preferible al menos 99%, de la forma más preferible al menos 99,5% puro, e incluso de la forma más preferible 100% en peso puro del material de polipéptido total presente en la preparación.

55 Los polipéptidos de la presente invención están preferiblemente en una forma sustancialmente pura, es decir, que la preparación de polipéptido carece esencialmente de otro material de polipéptido con el cual es original o recombinantemente asociado.

60 Esto puede realizarse, por ejemplo, preparando el polipéptido por métodos recombinantes bien conocidos o por métodos de purificación tradicional.

ES 2 558 698 T3

5 [0018] Polipéptido maduro: el término "polipéptido maduro" se define aquí como un polipéptido con actividad de esterasa que está en su forma final tras la traducción y modificación postraducciona, tal como tratamiento N-terminal, truncamiento C-terminal, glicosilación, fosforilación, etc. En un aspecto preferido, el polipéptido maduro es aminoácidos de 21 a 520 de SEC ID n°: 2 basado en el programa SignalP que predice que los aminoácidos 1 a 20 de SEC ID n°: 2 son un péptido señal.

10 [0019] Secuencia codificante de polipéptido maduro: el término "secuencia codificante de polipéptido maduro" se define aquí como una secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido maduro con actividad de esterasa. En un aspecto preferido, la secuencia codificante de polipéptido maduro es nucleótidos 61 a 1560 de SEC ID n°: 1 basada en el programa SignalP que predice que nucleótidos 1 a 60 de SEC ID n°: 1 codifican un péptido señal.

15 [0020] Identidad: la relación entre dos secuencias de aminoácido o entre dos secuencias de nucleótidos se describe por el parámetro "identidad".

20 [0021] Para el fin de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) como implementado en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends in Genetics 16: 276- 277), preferiblemente versión 3.0.0 o posterior.

Los parámetros opcionales usados son penalización por apertura de gap de 10, penalización por extensión de gap de 0,5, y el matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión de EMBOSS de BLOSUM62).

El resultado de Needle marcado "identidad más larga" (obtenido utilizando la opción -nobrief) se usa como la identidad en porcentaje y es calculado de la siguiente manera:

$$25 \quad \left(\frac{\text{Residuos idénticos} \times 100}{\text{Longitud de Alineamiento} - \text{Número Total de Gaps en Alineamiento}} \right)$$

30 [0022] Para el fin de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de desoxirribonucleótido se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970, supra) como implementado en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, supra), preferiblemente versión 3,0,0 o posterior.

Los parámetros opcionales usados son penalización por apertura de gap de 10, penalización por extensión de gap de 0,5, y el matriz de sustitución EDNAFULL (versión de EMBOSS de NCBI NUC4.4).

El resultado de Needle marcado "identidad más larga" (obtenido utilizando la opción -nobrief) se usa como la identidad en porcentaje y es calculado de la siguiente manera:

$$35 \quad \left(\frac{\text{Desoxirribonucleótidos Idénticos} \times 100}{\text{Longitud de Alineamiento} - \text{Número Total de Gaps en Alineamiento}} \right)$$

40 [0023] Secuencia homóloga: el término "secuencia homóloga" se define aquí como una proteína predicha que da un valor E (o puntuación de expectativa) inferior a 0,001 en una búsqueda tfasty (Pearson, W.R., 1999, in Bioinformatics Methods and Protocols, S. Misener and S. A. Krawetz, ed., pp. 185-219) con la esterasa Myrothecium sp. de SEC ID NO:2 o el polipéptido maduro de la misma.

45 [0024] Fragmento de polipéptido: el término "fragmento de polipéptido" se define aquí como un polipéptido con un aminoácido o más (diferentes) eliminados de la amino y/o carboxilo terminal del polipéptido maduro de SEC ID n°: 2; o una secuencia homóloga de la misma; donde el fragmento tiene actividad de esterasa.

En un aspecto preferido, un fragmento contiene al menos 250 residuos de aminoácidos, de forma más preferible al menos 300 residuos de aminoácidos, y de la forma más preferible al menos 450 residuos de aminoácidos, del polipéptido maduro de SEC ID n°: 2 o una secuencia homóloga del mismo.

50 [0025] Subsecuencia: el término "subsecuencia" se define aquí como una secuencia de nucleótido con un nucleótido o más (diferentes) eliminados del extremo 5' y/o 3' de la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n°: 1; o una secuencia homóloga de la misma; donde la subsecuencia codifica un fragmento de polipéptido con actividad de esterasa.

55 En un aspecto preferido, una subsecuencia contiene al menos 750 nucleótidos, de forma más preferible al menos 900 nucleótidos, y de la forma más preferible al menos 1350 nucleótidos de la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n°: 1 o una secuencia homóloga de la misma.

[0026] Variante alélica: el término "variante alélica" denota aquí cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa la misma localización cromosómica.

60 La variación alélica surge naturalmente a través de mutación, y puede resultar en el polimorfismo dentro de poblaciones.

ES 2 558 698 T3

Las mutaciones de gen pueden ser silenciosas (ningún cambio en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos con secuencias de aminoácidos alteradas.

Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

5 [0027] Polinucleótido aislado: el término "polinucleótido aislado" como usado aquí se refiere a un polinucleótido que es aislado de una fuente.

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

[0028] Polinucleótido sustancialmente puro: el término "polinucleótido sustancialmente puro" como usado aquí se refiere a una preparación polinucleótida libre de otros nucleótidos extraños o indeseados y en una forma adecuada para su uso dentro de sistemas de producción de proteína genéticamente modificada.

15 Así, un polinucleótido sustancialmente puro contiene como mucho 10%, preferiblemente como mucho 8%, de forma más preferible como mucho 6%, de forma más preferible como mucho 5%, de forma más preferible como mucho 4%, de forma más preferible como mucho 3%, incluso de forma más preferible como mucho 2%, de la forma más preferible como mucho 1%, e incluso de la forma más preferible como mucho 0,5% en peso de otro material polinucleótido con el cual es original o recombinantemente asociado.

20 Un polinucleótido sustancialmente puro puede, no obstante, incluir regiones 5' y 3' de origen natural no traducidas, tales como promotores y terminadores.

Se prefiere que el polinucleótido sustancialmente puro sea al menos 90% puro, preferiblemente al menos 92% puro, de forma más preferible al menos 94% puro, de forma más preferible al menos 95% puro, de forma más preferible al menos 96% puro, de forma más preferible al menos 97%, puro incluso de forma más preferible al menos 98% puro, de la forma más preferible al menos 99%, e incluso de la forma más preferible al menos 99,5% en peso puro.

25 Los polinucleótidos de la presente invención están preferiblemente en una forma sustancialmente pura, es decir, que la preparación de polinucleótidos carece esencialmente de otro material de polinucleótidos con el cual es original o recombinantemente asociado.

30 Los polinucleótidos pueden ser de origen genómico ADNc, ARN, semisintético, sintético, o cualquier combinaciones de los mismos.

[0029] Secuencia codificante: cuando se usa aquí el término "secuencia codificante" significa una secuencia de nucleótidos, que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de su producto proteínico.

35 Los límites de la secuencia codificante están generalmente determinados por un marco de lectura abierto, que empieza normalmente con el codón de inicio ATG o codones de inicio alternativos tales como GTG y TTG y extremidades con un codón de terminación tales como TAA, TAG, y TGA.

La secuencia codificante puede ser un ADN, ADNc, secuencia de nucleótidos sintética o recombinante.

[0030] ADNc: el término "ADNc" se define aquí como una molécula de ADN que se puede preparar por transcripción inversa de una molécula de ARNm madura empalmada obtenida de una célula eucariota. Al ADNc le faltan secuencias intron que están normalmente presentes en el ADN genómico correspondiente.

40 La transcripción de ARN inicial primaria es un precursor a ARNm que se procesa a través de una serie de pasos antes de aparecer como ARNm empalmado maduro.

45 Estos pasos incluyen la eliminación de secuencias de intrón por un proceso llamado empalme. ADNc derivado de ARNm carece, por lo tanto, de secuencias de intrón.

[0031] Constructo de ácidos nucleicos: el término "constructo de ácidos nucleicos" como se utiliza en este caso se refiere a una molécula de ácido nucleico, bien uncatenaria o bicatenaria, que es aislada de un gen de origen natural o que se modifica para contener segmentos de ácidos nucleicos de un modo que de lo contrario no existiría en la naturaleza o que es sintético.

50 El término constructo de ácidos nucleicos es sinónimos del término "casete de expresión" cuando el constructo de ácidos nucleicos contiene las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia codificante de la presente invención.

[0032] Secuencias de control: el término "secuencias de control" se define aquí para incluir todos los componentes necesarios para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención.

55 Cada secuencia de control puede ser nativa o extranjera a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido o nativa o extranjero entre sí.

60 Tales secuencias de control incluyen, pero de forma no limitativa, una secuencia de poliadenilación líder, secuencia de propéptido, promotor, secuencia de péptido señal, y terminador de transcripción.

Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor, y señales de parada transcripcionales y traslacionales.

ES 2 558 698 T3

Las secuencias de control se pueden proporcionar con enlaces con el objetivo de introducir sitios de restricción específicos que facilitan el ligamiento de las secuencias de control con la región de codificación de la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido.

5 [0033] Operativamente enlazado: el término "operativamente enlazado" denota aquí una configuración en la que una secuencia de control se coloca en una posición apropiada relativa a la secuencia de codificación de la secuencia polinucleótida tal que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia codificante de un polipéptido.

10 [0034] Expresión: el término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción del polipéptido incluyendo, pero no limitado, transcripción, modificación postranscripcional, movimiento, modificación postraduccional, y secreción.

15 [0035] Vector de expresión: el término "vector de expresión" se define aquí como una molécula de ADN lineal o circular que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención y es operativamente enlazado a nucleótidos adicionales que proveen a su expresión.

[0036] Célula huésped: el término "célula huésped", como se utiliza en este caso, incluye cualquier tipo celular que sea susceptible a transformación, transfección, transducción, y similar con un constructo de ácidos nucleicos o vector de expresión que comprende un polinucleótido de la presente invención.

20 [0037] Modificación: el término "modificación" significa aquí cualquier modificación química del polipéptido que consiste en el polipéptido maduro de SEC ID NO:2; o una secuencia homóloga de la misma; así como manipulación genética de la codificación de ADN como polipéptido.

La modificación puede ser una sustitución, una delección y/o una inserción de uno o varios aminoácidos (diferentes) al igual que reemplazos de una o varias cadenas laterales (diferentes) de aminoácidos.

25 [0038] Variante artificial: cuando se usa aquí, el término "variante artificial" significa un polipéptido con actividad de esterasa producido por un organismo que expresa una secuencia de polinucleótidos modificada de la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n° 1 o una secuencia homóloga de la misma.

30 La secuencia de nucleótidos modificada se obtiene a través de intervención humana por modificación de la secuencia de polinucleótidos descrita en la SEC ID n° 1 o una secuencia homóloga de la misma.

Descripción detallada de la invención

Polipéptidos con actividad de esterasa

35 [0039] En un primer aspecto, la presente invención se refiere a polipéptidos aislados que incluyen una secuencia de aminoácidos con un grado de identidad al polipéptido maduro de SEC ID NO:2 de preferiblemente al menos 75%, preferiblemente al menos 80%, de la forma más preferible al menos 85%, e incluso de la forma más preferible al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99%, que tienen actividad de esterasa y donde el polipéptido tiene al menos 90% de la actividad de esterasa del polipéptido maduro de SEC ID n°: 2 (de ahora en adelante "polipéptidos homólogos").

40 En un aspecto preferido, los polipéptidos homólogos tienen una secuencia de aminoácidos que difiere por diez aminoácidos, preferiblemente por cinco aminoácidos, de forma más preferible por cuatro aminoácidos, incluso de forma más preferible por tres aminoácidos, de la forma más preferible por dos aminoácidos, e incluso de la forma más preferible por un aminoácido del polipéptido maduro de SEC ID NO:2.

[0040] Un polipéptido de la presente invención preferiblemente comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:2

En otro aspecto preferido, el polipéptido comprende el polipéptido maduro de SEC ID NO:2.

En otro aspecto preferido, el polipéptido comprende aminoácidos 21 a 520 de SEC ID NO:2.

50 En otro aspecto preferido, el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:2.

[0041] En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a polipéptidos aislados con actividad de esterasa que son codificados por polinucleótidos que hibridan bajo preferiblemente condiciones de astringencia alta, y de la forma más preferible condiciones de astringencia altísimas con (i) la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID NO:1, (ii) la secuencia de ADNc contenida en la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID NO:1, o (iii) una cadena complementaria de longitud completa de (i) o (ii) y donde el polipéptido tiene al menos 90% de la actividad de esterasa del polipéptido maduro de SEC ID n°: 2. (J. Sambrook, E.F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d edition, Cold Spring Harbor, New York). En un aspecto preferido, la cadena complementaria es la cadena complementaria de longitud completa de la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID NO:1.

60 [0042] La secuencia de nucleótidos de SEC ID n° 1 o una subsecuencia de la misma; así como la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:2; o un fragmento de la misma; se puede usar para diseñar sondas de ácido nucleico para

ES 2 558 698 T3

identificar y clonar polipéptidos de codificación de ADN con actividad de esterasa de tensiones de diferente géneros o especies según métodos bien conocida en la técnica. En particular, tales sondas se pueden usar para hibridación con el genómico o ADNc del género o especies de interés, siguiendo procedimientos de transferencia Southern estándar, para identificando y aislar el gen correspondiente en él.

5 Tales sondas pueden ser considerablemente más cortas que toda la secuencia, pero deberían tener al menos 14, preferiblemente al menos 25, de forma más preferible al menos 35, y de la forma más preferible al menos 70 nucleótidos de longitud.

Es, no obstante, preferido que la sonda de ácido nucleico sea al menos 100 nucleótidos de longitud.

10 Por ejemplo, la sonda de ácido nucleico puede tener al menos 200 nucleótidos, preferiblemente al menos 300 nucleótidos, de forma más preferible al menos 400 nucleótidos, o de la forma más preferible al menos 500 nucleótidos de longitud.

Se pueden utilizar sondas incluso más largas, por ejemplo, sondas de ácido nucleico que tienen preferiblemente al menos 600 nucleótidos, de forma más preferible al menos 700 nucleótidos, incluso de forma más preferible al menos 800 nucleótidos, o de la forma más preferible al menos 900 nucleótidos de longitud.

15 Tanto sondas ADN como ARN pueden usarse.

Las sondas están típicamente marcadas para la detección del gen correspondiente (por ejemplo, con ^{32}P , ^3H , ^{35}S , biotina, o avidina).

Tales sondas están comprendidas en la presente invención.

20 [0043] Una biblioteca genómica de ADN o ADNc obtenida a partir de dichas otras cepas pueden, por lo tanto, ser seleccionados para ADN que hibridiza con las sondas anteriormente descritas y codifica un polipéptido con actividad de esterasa.

Genómico u otro ADN de dichas otras cepas se pueden separar por electroforesis en gel de poliacrilamida o agarosa, u otras técnicas de separación.

25 ADN de las bibliotecas o el ADN separado se pueden transferir e inmovilizar en la nitrocelulosa u otro material portador adecuado.

Para identificar un clon o ADN que es homólogo a SEC ID nº 1 o una subsecuencia de la misma; el material portador es preferiblemente usado en una transferencia Southern.

30 [0044] Para el fin de la presente invención, hibridación indica que la secuencia de nucleótidos hibridiza a una sonda de ácido nucleico marcado que corresponde con la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID nº 1; secuencia de ADNc contenida en la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID nº 1; su cadena complementaria de longitud completa; o una subsecuencia de la misma; bajo condiciones de astringencia de altas a altísimas.

35 Moléculas a la que las sonda de ácido nucleico hibridiza bajo estas condiciones se pueden detectar usando, por ejemplo, película radiográfica.

[0045] En un aspecto preferido, la sonda de ácido nucleico es la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID NO:1.

En otro aspecto preferido, la sonda de ácido nucleico es los nucleótidos de 61 a 1560 de SEC ID NO:1.

40 En otro aspecto preferido, la sonda de ácido nucleico es una secuencia de polinucleótidos que codifica el polipéptido de SEC ID NO:2.

En otro aspecto preferido, la sonda de ácido nucleico es SEC ID NO:1.

45 En otra divulgación preferida, la sonda de ácido nucleico es la secuencia de polinucleótidos contenida en el plásmido contenida en *E. coli* DSM19428, donde la secuencia de polinucleótidos de la misma codifica un polipéptido con actividad de esterasa.

En otra divulgación preferida, la sonda de ácido nucleico es la región de codificación de polipéptido maduro contenida en el plásmido contenido en *E. coli* DSM19428.

50 [0046] Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, condiciones de astringencia de muy bajas a altísimas son definidas como prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 0,3% SDS, 200 µLg/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y 25% formamida para astringencias muy bajas y bajas, 35% formamida para astringencias medias y medio-altas, o 50% formamida para astringencias altas y altísimas, seguido de procedimientos de transferencia Southern estándar durante 12 a 24 horas óptimamente.

55 [0047] Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, el material portador es finalmente lavado tres veces cada uno durante 15 minutos usando 2X SSC, 0,2% SDS preferiblemente a 45°C (astringencia muy baja), de forma más preferible a 50°C (astringencia baja), de forma más preferible a 55°C (astringencia media), de forma más preferible a 60°C (astringencia medio alta), incluso de forma más preferible a 65°C (astringencia alta), y de la forma más preferible a 70°C (astringencia altísima).

60 [0048] Para sondas cortas que tienen de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, las condiciones de astringencia son definidas como prehibridación, hibridación, y lavado de post-hibridación a

ES 2 558 698 T3

alrededor de entre 5°C y 10°C por debajo del T_m calculado utilizando el cálculo según Bolton y McCarthy (1962, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 48:1390) en 0,9 M NaCl, 0,09 M Tris-HCl pH 7,6, 6 mM EDTA, 0,5% NP-40, 1X solución de Denhardt, 1 mM pirofosfato de sodio, 1 mM fosfato monobásico de sodio, 0,1 mM ATP, y 0,2 mg de levadura ARN por ml según procedimientos de transferencia Southern estándar durante de 12 a 24 horas óptimamente.

[0049] Para sondas cortas que tienen de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, el material portador se lava una vez en 6X SSC más 0,1% SDS durante 15 minutos y dos veces cada durante 15 minutos usando 6X SSC a 5°C a 10°C por debajo del T_m calculado.

[0050] En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a polipéptidos aislados con actividad de esterasa codificados por polinucleótidos que comprenden o consisten en secuencias de nucleótidos que tienen un grado de identidad con la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n°: 1 de preferiblemente al menos 75%, de forma más preferible al menos 80%, de forma más preferible al menos 85%, incluso de forma más preferible al menos 90%, de la forma más preferible al menos 95%, e incluso de la forma más preferible 96%, 97%, 98%, o 99%, que codifican un polipéptido activo y donde el polipéptido tiene al menos 90% de la actividad de esterasa del polipéptido maduro de SEC ID n°: 2.

Ver sección polinucleótida en el presente documento.

[0051] En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a variantes que comprenden una sustitución, delección, y/o inserción del polipéptido maduro de SEC ID NO:2 donde el número total de sustituciones de aminoácidos, delecciones y/o inserciones del polipéptido maduro de SEC ID n°: 2 es de entre 1 y 10 y donde el polipéptido tiene al menos 90% de la actividad de esterasa del polipéptido maduro de SEC ID n°: 2.

Preferiblemente, los cambios aminoácidos son de naturaleza menor, es decir sustituciones de aminoácidos conservadores o inserciones que significativamente no afectan el plegado y/o actividad de la proteína; delecciones pequeñas, típicamente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; extensiones terminales pequeñas de amino o carboxilo, tales como un residuo de metionina aminoterminal; un péptido enlazador pequeño de hasta aproximadamente 20-25 residuos; o una extensión pequeña que facilita la purificación por cambio de carga de red u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epítopo antigénico o un dominio de enlace.

[0052] Los ejemplos de sustituciones conservadoras están en el grupo de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina).

Sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran actividad específica se conocen en la técnica y son descritas, por ejemplo, por H. Neurath and R.L. Hill, 1979, In, The Proteins, Academic Press, New York.

Los cambios que ocurren con 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.

[0053] Además de los 20 aminoácidos estándar, aminoácidos no estándar (tales como 4-hidroxi prolina, lisina de 6-n-metilo, ácido de 2-aminoisobutírico, isovalina, y serina de alfa-metilo) se pueden sustituir por residuos de aminoácidos de un polipéptido tipo salvaje.

Un número limitado de aminoácidos no conservadores, aminoácidos que no se codifican por el código genético, y aminoácidos no naturales se pueden sustituir por residuos de aminoácidos. Los "aminoácidos no naturales" han sido modificados después las síntesis de proteína, y/o tienen una estructura química en su cadena(s) lateral diferente de la de los aminoácidos estándar.

Aminoácidos no naturales pueden ser químicamente sintetizados y, preferiblemente, están disponibles comercialmente, e incluyen ácido pipercolico, ácido carboxílico de tiazolidina, dehidroprolina, 3- y 4-metilproline, y 3,3-dimetilproline.

[0054] Alternativamente, los cambios aminoácidos son de tal naturaleza que las propiedades físico químicas de los polipéptidos son alteradas.

Por ejemplo, los cambios aminoácidos pueden mejorar la termoestabilidad del polipéptido, alterar la especificidad de sustrato, cambiar el pH óptimo, y similar.

[0055] Aminoácidos esenciales en el polipéptido original se pueden identificar según procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de escaneado de alanina Cunningham and Wells, 1989, Science 244: 1081-1085).

En la última técnica, mutaciones de alanina única se introducen en cada residuo en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se evalúan para buscar actividad biológica (es decir actividad de esterasa) para identificar residuos aminoácidos que son críticos a la actividad de la molécula.

Ver también, Hilton et al., 1996, J. Biol. Chem. 271: 4699-4708.

ES 2 558 698 T3

El sitio activo de la enzima u otra interacción biológica puede también estar determinado por el análisis físico de estructura, como determinado por técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción electrónica, o marcaje por fotoafinidad, conjuntamente con mutación de aminoácidos de sitio de contacto putativo.

Ver, por ejemplo, de Vos et al., 1992, Science 255: 306-312 ; Smith et al., 1992, J. Mol.

5 Biol. 224: 899-904; Wlodaver et al., 1992, FEBS Lett. 309: 59-64.

Los identidades de aminoácidos esenciales también pueden ser inferidos de análisis de identidades con polipéptidos que se relacionan con un polipéptido según la invención.

10 [0056] Sustituciones de aminoácidos únicas o múltiples, deleciones, y/o inserciones pueden ser hechas y evaluadas usando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación, y/o redistribución, seguido de un procedimiento de selección pertinente, tales como los descrito por Reidhaar-Olson and Sauer, 1988, Science 241: 53-57 ; Bowie and Sauer, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. US 86: 2152-2156; WO 95/17413; o WO95/22625.

15 Otros métodos que se pueden usar incluyen PCR con tendencia al error, presentación en fagos (por ejemplo, Lowman et al., 1991, Biochem. 30: 10832-10837; patente US n° 5,223,409; WO92/06204), y mutagénesis dirigida por región (Derbyshire et al., 1986, gen 46: 145; Ner et al., 1988, DNA 7: 127).

[0057] Métodos de mutagénesis/redistribución se pueden combinar con métodos de selección automatizados de alto rendimiento para detectar actividad de polipéptidos mutagenizados clonados expresados por células huésped (Ness et al., 1999, Nature Biotechnology 17: 893-896).

20 Moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos activos se pueden recuperar de las células huésped y secuenciar rápidamente utilizando métodos estándar en la técnica. Estos métodos permiten la determinación rápida de la importancia de residuos de aminoácidos individuales en un polipéptido de interés, y se pueden aplicar a polipéptidos de estructura desconocida.

25 [0058] El número total de sustituciones de aminoácidos, deleciones y/o inserciones del polipéptido maduro de SEC ID NO:2, tales como aminoácidos de 21 a 520 de SEC ID NO:2, es 10, preferiblemente 9, de forma más preferible 8, de forma más preferible 7, de forma más preferible como mucho 6, de forma más preferible 5, de forma más preferible 4, incluso de forma más preferible 3, de la forma más preferible 2, e incluso de la forma más preferible 1.

30 Fuentes de polipéptidos con actividad de esterasa

[0059] Un polipéptido de la presente invención puede ser obtenido de microorganismos de cualquier género.

35 Para el fin de la presente invención, el término "obtenido de" como se utilizan en este caso en relación con una fuente dada significará que el polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos se produce por la fuente o por una cepa donde la secuencia de nucleótidos de la fuente ha sido insertada.

En un aspecto preferido, el polipéptido obtenido de una fuente dada es secretada extracelularmente.

[0060] Un polipéptido con actividad de esterasa de la presente invención puede ser un polipéptido bacteriano.

40 Por ejemplo, el polipéptido puede ser un polipéptido bacteriano gram positivo tal como un polipéptido Bacillus, Streptococcus, Streptomyces, estafilococo, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Clostridium, Geobacillus, u Oceanobacillus con actividad de esterasa, o un polipéptido bacteriano Gram negativo tal como un polipéptido E. coli, Pseudomonas, Salmonella, Campylobacter, Helicobacteria, Flavobacterium, Fusobacterium, Ilyobacter, Neisseria, o Ureaplasma con actividad de esterasa.

45 [0061] En una divulgación preferida, el polipéptido es un polipéptido Bacillus alkalophilus, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus brevis, Bacillus circulans, Bacillus clausii, Bacillus coagulans, Bacillus firmus, Bacillus lautus, Bacillus lentus, Bacillus licheniformis, Bacillus megaterium, Bacillus pumilus, Bacillus stearothermophilus, Bacillus subtilis o Bacillus thuringiensis con actividad de esterasa.

50 [0062] En otra divulgación preferida, el polipéptido es un Streptococcus equisimilis, Streptococcus pyogenes, Streptococcus uberis, o Streptococcus equi subsp. Zooepidemicus polipéptido con actividad de esterasa.

[0063] En otra divulgación preferida, el polipéptido es un polipéptido Streptomyces achromogenes, Streptomyces avermitilis, Streptomyces coelicolor, Streptomyces griseus, o Streptomyces lividans con actividad de esterasa.

55 [0064] Un polipéptido con actividad de esterasa de la presente invención también puede ser un polipéptido fúngico, y de forma más preferible un polipéptido de levadura tal como un polipéptido Candida, Kluyveromyces, Pichia, Saccharomyces, Schizosaccharomyces, o Yarrowia con actividad de esterasa; o de forma más preferible un polipéptido fúngico filamentoso tal como un polipéptido Acremonium, Agaricus, Alternaria, Aspergillus, Aureobasidium, Botryosphaeria, Ceriporiopsis, Chaetomidium, Chrysosporium, Claviceps, Cochliobolus, Coprinopsis, Coptotermes, Corynascus, Cryphonectria, Cryptococcus, Diplodia, Exidia, Filibasidium, Fusarium, Gibberella, Holomastigotoides, Humicola, Irpex, Lentinula, Leptosphaeria, Magnaporthe, Melanocarpus, Meripilus, Mucor, Myceliophthora, Neocallimastix,

60

ES 2 558 698 T3

Neurospora, Paecilomices, Penicillium, Phanerochaete, Piromices, Poitrasia, Pseudoplectania, Pseudotrichonympha, Rhizomucor, Schizofilum, Scitalidio, Talaromyces, Termoascus, Thielavia, Tolipocladium, Trichoderma, Trichophaea, Verticillium, Volvariella, o Xylaria con actividad de esterasa.

5 [0065] En una divulgación preferida, el polipéptido es un polipéptido *Saccharomyce carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, o *Saccharomyces oviformis* con actividad de esterasa.

10 [0066] En otra divulgación preferida, el polipéptido es un *Acremonium cellulolyticus*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*,
15 *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochromum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola grisea*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Irpex lacteus*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Thielavia achromatica*, *Thielavia albomyces*, *Thielavia albopilosa*, *Thielavia australeinsis*, *Thielavia fimeti*, *Thielavia microspora*, *Thielavia ovispora*, *Thielavia peruviana*, *Thielavia spededonium*, *Thielavia setosa*, *Thielavia subthermophila*, *Thielavia terrestris*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, o *Trichoderma viride* que tiene actividad de esterasa.

25 [0067] En otro aspecto preferido, el polipéptido es un polipéptido *Myrothecium*.
En un aspecto más preferido, el polipéptido es un polipéptido *Myrothecium* sp. con actividad de esterasa, por ejemplo, el polipéptido que comprenden el polipéptido maduro de SEC ID NO:2.

30 [0068] Se entiende que para las especies anteriormente mencionadas la invención abarca los estados perfectos e imperfectos, y otros equivalentes taxonómicos, por ejemplo, anamorfos, independientemente del nombre de la especie por el que son conocidos.
Expertos en la técnica reconocerán fácilmente la identidad de equivalentes apropiados.

35 [0069] Cepas de estas especies son fácilmente accesible al público en un número de colecciones de cultivo, como la American Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS), y Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

40 [0070] Además, tales polipéptidos se pueden identificar y obtener de otras fuentes incluyendo microorganismos aislados de la naturaleza (por ejemplo, tierra, abonos, agua, etc.) utilizando las sondas mencionadas arriba.
Técnicas para el aislamiento de microorganismos de hábitats naturales se conocen en la técnica. El polinucleótido puede luego ser obtenido cribando de forma similar una biblioteca genómica o de ADNc de tal microorganismo.
Una vez una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido ha sido detectada con la sonda(s), el polinucleótido se puede aislar o clonar por utilización de técnicas que son bien conocidas por los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, supra).

45 [0071] Polipéptidos de la presente invención también incluyen polipéptidos fusionados o polipéptidos divisibles de fusión donde otro polipéptido se fusiona en el N-término o el C-término del polipéptido o fragmento del mismo.
Un polipéptido fusionado se produce por fundición de una secuencia de nucleótidos (o una parte de la misma) codificando otro polipéptido a una secuencia de nucleótidos (o una parte de la misma) de la presente invención.
50 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 éstas están en marco y que la expresión del polipéptido fusionado está bajo control del mismo promotor(es) y terminador.

55 [0072] Un polipéptido de fusión puede además comprender un sitio de escisión.
En la secreción de la proteína de fusión, el sitio es dividido liberando el polipéptido con actividad de esterasa de la proteína de fusión.

60 Ejemplos de sitios de escisión incluyen, pero de forma no limitativa, un sitio Kex2 que codifica el dipéptido Lys-Arg Martin et al., 2003, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 3: 568-76 ; Svetina et al., 2000, J. Biotechnol. 76: 245-251 ; Rasmussen-Wilson et al., 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63: 3488-3493 ; Ward et al., 1995, Biotechnology 13: 498-503 ; and Contreras et al., 1991, Biotechnology 9: 378-381), un sitio Ile-(Glu o Asp)-Gly-Arg, que se divide por una proteasa de factor Xa después del residuo de arginina (Eaton et al., 1986, Biochem. 25: 505-512); un sitio Asp-Asp-Asp-Asp-Ly, que se divide por una

ES 2 558 698 T3

enteroquinasa después de la lisina (Collins-Racie et al., 1995, *Biotechnology* 13: 982-987); un sitio His- Tyr-Glu o His-Tyr-Asp, que se divide por Genenase I (Carter et al., 1989, *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 6: 240-248); un sitio Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser, que se divide por trombina después del Arg (Stevens, 2003, *Drug Discovery World* 4: 35-48); un sitio Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln- Gly, que se divide por proteasa TEV después del Gin (Stevens, 2003, supra); y un sitio Leu-Glu-Val- Leu-Phe-Gln-Gly-Pro, que se divide por una forma genéticamente modificada de proteasa de rinovirus de humano 3C después del Gin (Stevens, 2003, supra).

Polinucleótidos

10 [0073] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que comprenden o consisten en secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos con actividad de esterasa de la presente invención.

[0074] En un aspecto preferido, la secuencia de nucleótidos comprende o consiste en SEC ID NO:1.

15 En otra divulgación más preferido, la secuencia de nucleótidos comprende o consiste en la secuencia contenida en el plásmido contenido en *E. coli* DSM19428.

En otro aspecto preferido, la secuencia de nucleótidos comprende o consiste en la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID NO:1.

En otro aspecto preferido, la secuencia de nucleótidos comprende o consiste en nucleótidos de 61 a 1560 de SEC ID NO:1.

20 En otra divulgación más preferido, la secuencia de nucleótidos comprende o consiste en la secuencia codificante de polipéptido maduro contenida en el plásmido contenido en *E. coli* DSM19428.

La presente invención también abarca secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos que comprenden o consisten en la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO:2 o el polipéptido maduro de la misma, que difiere de SEC ID NO:1 o la secuencia codificante de polipéptido maduro de la misma en virtud de la degeneración del código genético.

25 La presente divulgación también se refiere a subsecuencias de SEC ID NO:1 que codifican fragmentos de SEC ID NO:2 que tienen actividad de esterasa.

[0075] La presente invención también se refiere a polinucleótidos mutantes que comprenden o consisten en al menos una mutación en la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID NO:1, donde la secuencia de nucleótidos mutante codifica el polipéptido maduro de SEC ID NO:2.

30 [0076] Las técnicas usadas para aislar o clonar un polinucleótido que codifica un polipéptido se conocen en la técnica e incluyen aislamiento de ADN genómico, preparación de ADNc, o una combinación de los mismos.

35 La clonación de los polinucleótidos de la presente invención de tal ADN genómico puede ser efectuada, por ejemplo, usando la reacción en cadena de polimerasa bien conocida (PCR) o selección de anticuerpo de bibliotecas de expresión para detectar fragmentos de ADN clonado con características estructurales compartidas.

Ver, por ejemplo, Innis et al., 1990, *PCR: A Guide to Methods and Application*, Academic Press, New York .

Otros procedimientos de amplificación de ácido nucleico tales como reacción en cadena de la ligasa (LCR), transcripción activada ligada (LAT) y amplificación basada en secuencias de nucleótidos (NASBA) pueden ser utilizados.

40 Los polinucleótidos se pueden clonar de una cepa de *Myrothecium*, u otro organismo o relacionado y así, por ejemplo, puede ser un alélico o variante de especies de la región de codificación de polipéptido de la secuencia de nucleótidos.

[0077] La presente divulgación también se refiere a polinucleótidos aislados que comprenden o consisten en secuencias de nucleótidos que tienen un grado de identidad a la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID NO:1 de preferiblemente al menos identidad del 45%, de forma más preferible al menos 50%, de forma más preferible al menos 65%, de forma más preferible al menos 75%, de forma más preferible al menos 80%, de forma más preferible al menos 85%, incluso de forma más preferible al menos 90%, de la forma más preferible al menos 95%, e incluso de la forma más preferible al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99%, que codifica un polipéptido activo.

50 [0078] La modificación de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser necesaria para la síntesis de polipéptidos sustancialmente similares al polipéptido.

El término "sustancialmente similar" al polipéptido se refiere a formas que ocurren de manera no natural del polipéptido.

Estos polipéptidos pueden diferir en alguna forma diseñada del polipéptido aislado de su fuente nativa, por ejemplo, variantes artificiales que difieren en actividad específica, termoestabilidad, pH óptimo, o similar.

55 La secuencia variante se puede construir basándose en la secuencia de nucleótidos presentada como la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID NO:1, por ejemplo, una subsecuencia de la misma, y/o por introducción de sustituciones de nucleótido que no dan lugar a otra secuencia de aminoácidos del polipéptido codificada por la secuencia de nucleótidos, pero que corresponden al uso de codón del organismo huésped destinado a la producción de la enzima, o por introducción de sustituciones de nucleótido que puede dar lugar a una secuencia de aminoácidos diferente.

60 Para una descripción general de sustitución de nucleótido ven por ejemplo, Ford et al., 1991, *Protein Expression and Purification* 2: 95-107.

[0079] Será aparente para los expertos en la técnica que tales sustituciones pueden ser hechas fuera de las regiones críticas a la función de la molécula y todavía tener como resultado un polipéptido activo.

Residuos de aminoácidos esenciales para la actividad del polipéptido codificados por un polinucleótido aislado de la invención, y por lo tanto preferiblemente no sujetos a sustitución, se pueden identificar según procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de escaneado de alanina (ver, por ejemplo, Cunningham and Wells, 1989, supra).

En la última técnica, mutaciones se introducen en cada residuo positivamente cargado en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se evalúan buscando actividad de esterasa para identificar residuos aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula.

Sitios de interacción enzima-sustrato también pueden ser determinados mediante análisis de la estructura tridimensional como se determina en tales técnicas como el análisis de resonancia magnética nuclear, cristalografía o marcaje por fotoafinidad (ver, por ejemplo, de Vos et al., 1992, supra; Smith et al., 1992, supra; Wlodaver et al., 1992, supra).

[0080] La presente invención también se refiere a polipéptidos de codificación de polinucleótidos aislados de la presente invención, que hibridan bajo condiciones de astringencia altas, y de la forma más preferible condiciones de astringencia altísimas con (i) la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID NO:1, (ii) la secuencia de ADNc contenida en la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID NO:1, o (iii) una cadena complementaria de longitud completa de (i) o (ii); donde el polipéptido tiene como mínimo 90% de la actividad de esterasa del polipéptido maduro de SEC ID n°: 2 (Sambrook et al., 1989, supra), tal y como se define aquí.

En un aspecto preferido, la cadena complementaria es la cadena complementaria de longitud completa de la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID NO:1.

[0081] La presente divulgación también se refiere a polinucleótidos aislados obtenidos (a) hibridando de una población de ADN bajo condiciones de astringencia muy bajas, bajas medias, medio altas, altas o altísimas con (i) la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID NO:1, (ii) la secuencia de ADNc contenida en la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID NO:1, o (iii) una cadena complementaria de longitud completa de (i) o (ii); y (b) aislando el polinucleótido de hibridación, que codifica un polipéptido con actividad de esterasa.

En un aspecto preferido, la cadena complementaria es la cadena complementaria de longitud completa de la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID NO:1.

Constructos de ácidos nucleicos

[0082] La presente invención también se refiere a constructos de ácidos nucleicos que incluyen un polinucleótido aislado de la presente invención operativamente enlazado a una o varias secuencias (diferentes) de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

[0083] Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de la presente invención se puede manipular en una variedad de formas para proveer expresión del polipéptido.

Manipulación de la secuencia del polinucleótido antes de su inserción en un vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión.

Las técnicas para secuencias polinucleótidas de modificación utilizando métodos de ADN recombinante se conocen bien en la técnica.

[0084] La secuencia de control puede ser una secuencia promotora apropiada, una secuencia de nucleótidos que se reconoce por una célula huésped por la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención.

La secuencia promotora contiene secuencias de control transcripcionales que median la expresión del polipéptido.

El promotor puede ser cualquier secuencia de nucleótidos que muestre actividad transcripcional en la célula huésped de elección incluyendo promotores mutantes, truncados e híbridos, y se pueden obtener de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares bien homólogos o heterólogo a la célula huésped.

[0085] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácidos nucleicos de la presente invención, especialmente en una célula huésped bacteriana, son los promotores obtenidos del operón lac de E. coli, gen de agarasa de Streptomyces coelicolor (dagA), gen de levansucrasa de Bacillus subtilis (sacB), gen de alfa-amilasa de Bacillus licheniformis (amilo), gen de amilasa maltogénica de Bacillus stearothermophilus (amyM), gen de alfa-amilasa de Bacillus amyloliquefaciens (amyQ), gen de penicilinas de Bacillus licheniformis (penP), genes xylA y xylB de Bacillus, y gen de beta-lactamasa procariótica ((Villa-Kamaroff et al., 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 3727-3731), así como el promotor tac (DeBoer et al., 1983, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80: 21-25).

Otros promotores son descritos en "Useful proteins from recombinant bacteria" en Scientific American, 1980, 242: 74-94 ; y en Sambrook et al., 1989, supra.

- 5 [0086] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácidos nucleicos de la presente invención en una célula huésped fúngica filamentosa son promotores obtenidas de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, alfa-amilasa estable en ácido de *Aspergillus niger*, *Aspergillus niger* o glucoamilasa de *Aspergillus awamori* (glaA), lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*, acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, amiloglucosidasa de *Fusarium venenatum* (WO00/56900), *Fusarium venenatum* Daria (WO00/56900), *Fusarium venenatum* Quinn (WO00/56900), proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* (WO96/00787), beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa de *Trichoderma reesei* yo, endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa de *Trichoderma reesei* IV, endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, xilanasa de *Trichoderma reesei* yo, xilanasa de *Trichoderma reesei* II, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei*, al igual que el promotor NA2-tpi (un híbrido de los promotores de los genes para alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* e isomerasa de fosfato de triosa de *Aspergillus oryzae*); y promotores mutantes, truncados e híbridos de los mismos.
- 10 [0087] En un huésped de levadura, promotores útiles se obtienen de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), galactocinasa de *Saccharomyces cerevisiae* (GAL1), deshidrogenasa de deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato de alcohol de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH1; aDH2/GAP) triosa fosfato isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae* (TPI), metalotioneína de *Saccharomyces cerevisiae* (CUP1), y quinasa de 3-fosfoglicerato de *Saccharomyces cerevisiae*.
Otros promotores útiles para células huésped de levadura son descritas por Romanos et al., 1992, *Yeast* 8: 423-488.
- 15 [0088] La secuencia de control también puede ser una secuencia terminadora de transcripción adecuada, una secuencia reconocida por una célula huésped para terminar la transcripción.
25 La secuencia terminadora es operativamente enlazada al terminal 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido.
Cualquier terminador que es funcional en la célula huésped de elección se puede utilizar en la presente invención.
- 30 [0089] Terminadores preferidos para células huésped fúngicas filamentosas son obtenidos de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*, y proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.
- 35 [0090] Terminadores preferidos para células huésped de levadura son obtenidos 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 son descritas por Romanos et al., 1992, *supra*.
- 40 [0091] La secuencia de control también puede ser una secuencia líder adecuada, una región no traducida de un ARNm que sea importante para traducción por la célula huésped.
La secuencia líder está operativamente enlazada al terminal 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido.
Cualquier secuencia líder que es funcional en la célula huésped de elección se puede utilizar en la presente invención.
- 45 [0092] Líderes preferidos para células huésped fúngicas filamentosas son obtenidos de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.
- 50 [0093] Líderes adecuados para células huésped de levadura son obtenidos de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), quinasa de 3-fosfoglicerato de *Saccharomyces cerevisiae*, alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae*, y deshidrogenasa de deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato de alcohol de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH2/GAP).
- 55 [0094] La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia operativamente enlazada al terminal 3' de la secuencia de nucleótidos y, cuando transcrito, se reconoce por la célula huésped como una señal para añadir residuos de poliadenosina a ARNm transcrito.
Cualquier secuencia de poliadenilación que sea funcional en la célula huésped de elección se puede utilizar en la presente invención.
- 60 [0095] Secuencias de poliadenilación preferidas para células huésped fúngicas filamentosas son obtenidas 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*.
- [0096] Secuencias de poliadenilación útil para células huésped de levadura son descritas por Guo y Sherman, 1995, *Molecular Cellular Biology* 15: 5983-5990.

- [0097] La secuencia de control también puede ser una secuencia codificadora de péptido señal que codifica para una secuencia de aminoácidos enlazada al amino terminal de un polipéptido y dirige el polipéptido codificado a la vía secretora de la célula.
- 5 El extremo 5' de la secuencia codificante de la secuencia de nucleótidos puede intrínsecamente contener una secuencia codificante del péptido señal naturalmente enlazado en el marco de lectura del movimiento con el segmento de la secuencia codificante que codifica el polipéptido segregado.
Alternativamente, el extremo 5' de la secuencia codificante puede contener una secuencia codificante del péptido señal que es extraño a la secuencia codificante.
- 10 La secuencia codificante de péptido señal foráneo se puede requerir donde la secuencia codificante no contiene naturalmente una secuencia codificante del péptido señal.
Alternativamente, la secuencia codificante del péptido señal foráneo puede simplemente reemplazar la secuencia codificante del péptido señal natural para mejorar secreción del polipéptido.
No obstante, cualquier secuencia codificante del péptido señal que dirige el polipéptido expresado en la vía secretora de una célula huésped de elección, es decir, segregada en un medio de cultivo, se puede utilizar en la presente invención.
- 15 [0098] Secuencias de codificación de péptido señal eficaces para células huésped bacterianas son las secuencias de codificación de péptido señal obtenidas de los genes para *Bacillus* amilasa maltogénica de NCIB 11837, alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, subtilisina de *Bacillus licheniformis*, beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis*, proteasas neutras de *Bacillus stearothermophilus* (nprT, nprS, nprM), proteasa de *Bacillus clausii* alcalina (aprH) y *Bacillus subtilis* prsA.
Otros péptidos señal son descritos por Simonen y Palva, 1993, *Microbiological Reviews* 57: 109-137 .
- 20 [0099] Secuencias de codificación de péptido señal eficaces para células huésped fúngicas filamentosas son las secuencias de codificación de péptido señal obtenidas de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, amilasa neutra de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, celulasa de *Humicola insolens*, endoglucanasa V de *Humicola insolens*, y lipasa *Humicola lanuginosa*.
- 25 [0100] Péptidos señal útiles para células huésped de levadura son obtenidos de los genes para alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae* e invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*.
Otras secuencias de codificación de péptido señal útil son descritas por Romanos et al., 1992, *supra*.
- 30 [0101] En un aspecto preferido, el péptido señal comprende o consiste en aminoácidos de 1 a 20 de SEC ID NO:2.
En otro aspecto preferido, la secuencia codificante del péptido señal comprende o consiste en nucleótidos de 1 a 60 de SEC ID NO:1.
- 35 [0102] La secuencia de control también puede ser una secuencia codificante de propéptido que codifica una secuencia de aminoácidos posicionada en el amino terminal de un polipéptido.
El polipéptido resultante es conocido como una proenzima o propolipéptido (o un zimógeno en algunas cajas).
Un propéptido es generalmente inactivo y se pueden convertir a un polipéptido activo maduro por escisión catalítica o autocatalítica del propéptido del propolipéptido.
La secuencia codificante de propéptido se puede obtener de los genes para proteasa alcalina de *Bacillus subtilis* (aprE), proteasa neutra de *Bacillus subtilis* (nprT), alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, y lacasa *myceliophthora thermophila* (WO95/33836).
- 40 45 [0103] Donde tanto el péptido señal como las secuencias de propéptido están presentes en el amino terminal de un polipéptido, la secuencia de propéptido está situada junto al amino terminal de un polipéptido y la secuencia de péptido señal está situado junto al amino terminal de la secuencia de propéptido.
- 50 [0104] También puede ser deseable añadir secuencias reguladoras que permiten la regulación de la expresión del polipéptido relativamente al crecimiento de la célula huésped.
Ejemplos de sistemas reguladores son aquellos que causan que la expresión del gen sea encendida o apagada en respuesta a una sustancia química o estímulo físico, con la presencia de un compuesto regulador.
Sistemas reguladores en sistemas procarióticos incluyen los sistemas operadores lac, tac Xyl y trp.
En la levadura, puede utilizarse el sistema ADH2 o sistema GAL1.
En hongos filamentosos, el promotor de TAKA alfa-amilasa, el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger*, y el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae* se pueden utilizar como secuencias reguladoras.
Otros ejemplos de secuencias reguladoras son aquellas que permiten la amplificación génica.
En sistemas eucarióticos, estas secuencias reguladoras 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 nucleótidos que codifica el polipéptido sería operativamente enlazada con la secuencia reguladora.
- 60

Vectores de expresión

- 5 [0105] La presente invención también se refiere a vectores de expresión recombinantes que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención, un promotor, y señales de parada transcripcional y traslacional. Las secuencias varias de ácido nucleico vario y de control anteriormente descritas se pueden juntar para producir un vector de expresión recombinante que pueda incluir uno o varios sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o sustitución de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido en tales sitios.
- 10 Alternativamente, la secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención se puede expresar por inserción de la secuencia de ácidos nucleicos o un constructo de ácidos nucleicos comprendiendo la secuencia en un vector apropiado para la expresión. En la creación del vector de expresión, la secuencia codificante se localiza en el vector de modo que la secuencia codificante está operativamente enlazada con las secuencias de control apropiadas para la expresión.
- 15 [0106] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o virus) que pueda ser convenientemente sometido a procedimientos de ADN recombinante y pueda provocar la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos. La elección del vector dependerá típicamente de la compatibilidad del vector con la célula huésped en la que el vector debe ser introducido.
- 20 Los vectores puede ser plásmidos circulares lineales o cerrados.
- [0107] El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, la replicación del cual es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma, o un cromosoma artificial.
- 25 El vector puede contener cualquier medio para asegurar autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando introducido en la célula huésped, es integrado en el genoma y replicado con el cromosoma(s) en que ha sido integrado. Además, un único vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ADN total a ser introducido en el genoma de la célula huésped, o un transposón pueden ser utilizados.
- 30 [0108] Los vectores de la presente invención preferiblemente contienen uno o varios marcadores seleccionables que permiten la 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 a auxótrofos, y similar.
- 35 [0109] Ejemplos de marcadores seleccionables bacterianos son los genes *dal* de *Bacillus subtilis* o *Bacillus licheniformis*, o marcadores que confieren resistencia antibiótica tales como resistencia ampicilina, canamicina, cloranfenicol, o tetraciclina. Marcadores adecuados para células huésped de levadura son *ADE2*, *HIS3*, *LEU2*, *LYS2*, *MET3*, *TRP1*, y *URA3*.
- 40 Marcadores seleccionables para el uso en una célula huésped fúngica filamentosa incluyen, pero de forma no limitativa, *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina-carbamoiltransferasa), *bar* (fosfonitricina acetiltransferasa), *hph* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrato-reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato-descarboxilasa), *sC* (adeniltransferasa de sulfato), y *trpC* (antranilato sintasa), al igual que equivalentes de los mismos. Preferidos para el uso en una célula de *Aspergillus* son los genes *amdS* y *pyrG* de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y el gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*.
- 45 [0110] Los vectores de la presente invención preferiblemente contienen un elemento(s) que permite integración estable del vector en el genoma de la célula huésped o replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.
- 50 [0111] Para integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede depender de la secuencia que codifica el polinucleótido el polipéptido o cualquier otro elemento del vector para la integración en el genoma por homólogos o recombinación no homóloga. Alternativamente, el vector puede contener secuencias de nucleótidos adicionales para dirigir integración por recombinación homóloga en el genoma de la célula huésped en una ubicación(es) precisa en el cromosoma(s).
- 55 Para aumentar la probabilidad de integración en una ubicación precisa, los elementos integracionales debería preferiblemente contener un número suficiente de ácidos nucleicos, tales como de 100 a 10,000 pares de bases, preferiblemente de 400 a 10,000 pares de bases, y de la forma más preferible de 800 a 10,000 pares de bases, que tienen un grado alto de identidad a la secuencia objetivo correspondiente para mejorar la probabilidad de recombinación homóloga.
- 60 Los elementos integracionales pueden ser cualquier secuencia que sea homóloga a la secuencia objetivo en el genoma de la célula huésped. Además, los elementos integracionales pueden ser secuencias de nucleótidos codificantes o no codificantes.

ES 2 558 698 T3

Por otro lado, el vector se puede integrar en el genoma de la célula huésped por recombinación no-homóloga.

[0112] Para replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación que permita al vector replicarse de manera autónoma en la célula huésped en cuestión.

5 El origen de replicación puede ser cualquier replicador plásmido mediante replicación autónoma que funciona en una célula.

El término "origen de replicación" o "replicador plásmido" es definido aquí como una secuencia de nucleótidos que habilita un plásmido o vector a replicar in vivo.

10 [0113] Ejemplos de orígenes bacterianos de replicación son los orígenes de replicación de plásmidos pBR322; pUC19; pACYC177, y pACYC184 que permiten replicación en el E. coli, y pUB110; pE194; pTA1060, y pAMB1 que permiten replicación en el Bacillus.

15 [0114] Ejemplos de orígenes de replicación para el uso en una célula huésped de levadura son el 2 micras origen de replicación, ARS1, ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3, y la combinación de ARS4 y CEN6.

[0115] Ejemplos de orígenes de replicación útil en una célula fúngica filamentosa son AMA1 y ANS1 (Gems et al., 1991, Gene 98: 61-67 ; Cullen et al., 1987, Nucleic Acids Research 15: 9163-9175 ; WO 00/24883).

20 Aislamiento del gen AMA1 y construcción de plásmidos o vectores que comprenden el gen se pueden realizar según los métodos descritos en WO00/24883.

[0116] Más de una copia de un polinucleótido de la presente invención se puede insertar en una célula huésped para aumentar producción del producto génico.

25 Un aumento en el número de copias del polinucleótido puede ser obtenido integrando al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped o incluyendo un gen marcador seleccionable amplificable con el polinucleótido donde células que contienen copias amplificadas del gen marcador seleccionable, y por lo tanto copias adicionales del polinucleótido, se pueden seleccionar mediante cultivo de las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

30 [0117] Los procedimientos usados para enlazar los elementos anteriormente descritos para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención son conocidos por un experto en la materia (ver, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, supra).

Células huésped

35 [0118] La presente invención también se refiere a células huésped recombinantes, que incluyen un polinucleótido aislado de la presente invención, que son ventajosamente usadas en la producción recombinante de los polipéptidos.

Un vector que comprende un polinucleótido de la presente invención se introduce en una célula huésped de modo que el vector es mantenido como un integrante cromosómico o como un vector extracromosomal que se duplica como se describe anteriormente.

40 El término "células huésped" abarca cualquier descendiente de una célula madre que sea no idéntico a la célula madre debido a mutaciones que ocurren durante la replicación.

La elección de una célula huésped dependerá en gran parte del gen que codifica el polipéptido y su fuente.

45 [0119] La célula huésped puede ser cualquier célula útil en la producción recombinante de un polipéptido de la presente invención, por ejemplo, un procariota o un eucariota.

[0120] La célula huésped procariótica puede ser cualquier bacteria Gram positiva o una bacteria Gram negativa.

50 Bacterias Gram positivas incluyen, pero no están limitadas a, Bacillus, Streptococcus, Streptomyces, estafilococo, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Clostridium, Geobacillus, y Oceanobacillus.

Bacterias Gram negativas incluyen, pero no están limitadas a, E. coli, Pseudomonas, Salmonella, Campylobacter, helicobacteria, Flavobacterium, Fusobacterium, Ilyobacter, Neisseria, y Ureaplasma.

[0121] La célula huésped bacteriana puede ser cualquier célula de Bacillus.

55 Células de Bacillus útiles en la práctica de la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, células de Bacillus alkalophilus, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus brevis, Bacillus circulans, Bacillus clausii, Bacillus coagulans, Bacillus firmus Bacillus lautus, Bacillus, lentus Bacillus licheniformis, Bacillus megaterium, Bacillus pumilus, Bacillus stearothermophilus, Bacillus subtilis, y bacillus thuringiensis.

60 [0122] En un aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus, lentus Bacillus licheniformis, Bacillus stearothermophilus o Bacillus subtilis.

En un aspecto más preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de Bacillus amyloliquefaciens.

ES 2 558 698 T3

En otro aspecto más preferido, la célula huésped bacteriana es una célula bacillus clausii.
En otro aspecto más preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de Bacillus licheniformis.
En otro aspecto más preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de Bacillus subtilis.

5 [0123] La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de streptococcus.
Células de streptococcus útiles en la práctica de la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, células Streptococcus equisimilis, Pyogenes streptococcus, Streptococcus uberis, y Streptococcus equi subesp. Zoepidemicus.

[0124] En un aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula Streptococcus equisimilis.
10 En otro aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula Streptococcus pyogenes.
En otro aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula Streptococcus uberis.
En otro aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula Streptococcus equi subesp. Zoepidemicus.

[0125] La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula Streptomyces.
15 Células Streptomyces útiles en la práctica de la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, células Streptomyces achromogenes, Streptomyces avermitilis, Streptomyces coelicolor, Streptomyces griseus, and Streptomyces lividans.

[0126] En un aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula Streptomyces achromogenes.
20 En otro aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula Streptomyces avermitilis.
En otro aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula Streptomyces coelicolor.
En otro aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula Streptomyces griseus.
En otro aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula Streptomyces lividans.

25 [0127] La introducción de ADN en una célula de Bacillus puede, por ejemplo, ser efectuada por transformación de bprotoplasto (ver, por ejemplo, Chang y Cohen, 1979, Molecular General Genetics 168: 111- 115), usando células competentes (ver, por ejemplo, Young and Spizizen, 1961, Journal of Bacteriology 81: 823- 829 , o Dubnau and Davidoff-Abelson, 1971, Journal of Molecular Biology 56: 209-221 , por electroporación (ver, por ejemplo, Shigekawa and Dower, 1988, Biotechniques 6: 742-751), o por conjugación (ver, por ejemplo, Koehler y Thorne, 1987, Journal of Bacteriology 169: 5271-5278).

30 La introducción de ADN en una célula E coli puede, por ejemplo, ser efectuada por transformación de protoplasto (ver, por ejemplo, Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166: 557-580) o electroporación (ver, por ejemplo, Dower et al., 1988, Nucleic Acids Res. 16: 6127-6145).

35 La introducción de ADN en una célula de Streptomyces puede, por ejemplo, ser efectuada por transformación de protoplasto y electroporación (ver, por ejemplo, Gong et al., 2004, Folia Microbiol. (Praha) 49: 399-405), por conjugación (ver, por ejemplo, Mazodier et al., 1989, J. Bacteriol. 171: 3583-3585), o por transducción (ver, por ejemplo, Burke et al., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU 98: 6289-6294).

40 La introducción de ADN en una célula de Pseudomonas puede, por ejemplo, ser efectuada por electroporación (ver, por ejemplo, Choi et al., 2006, J. Microbiol. Methods 64: 391-397) o por conjugación (ver, por ejemplo, Pinedo y Smets, 2005, Appl. Circundar. Microbiol. 71: 51-57). La introducción de ADN en una célula de streptococcus puede, por ejemplo, ser efectuada por competencia natural (ver, por ejemplo, Perry and Kuramitsu, 1981, infectado. Immun. 32: 1295-1297), por transformación de protoplasto (ver, por ejemplo, Catt y Jollick, 1991, Microbios. 68: 189-2070, por electroporación (ver, por ejemplo, Buckley et al., 1999, Appl. Environ. Microbiol. 65: 3800-3804) o por conjugación (ver, por ejemplo, Clewell, 1981, Microbiol. Rev. 45: 409-436). No obstante, cualquier método conocido en la técnica para
45 introducción ADN en una célula huésped puede ser usado.

[0128] La célula huésped también puede ser una eucariota, tal como una célula de mamífero, insecto, planta, o fúngica.

50 [0129] En un aspecto preferido, la célula huésped es una célula fúngica. "Fúngica" como se utiliza en este caso incluye el phyla Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, y Zygomycota (como definido por Hawkswort 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 el Hawkswort et al., 1995, supra, página 171) y todos los hongos mitospóricos (Hawkswort et al., 1995, supra).

55 [0130] En un aspecto más preferido, la célula huésped fúngica es una célula de levadura. "Levadura" como se utiliza en este caso incluye levadura ascoesporógena (Endomycetales), levadura basidioesporogénea, y levadura de los Fungi Imperfecti (Blastomicetos).

60 Ya que la clasificación de levadura puede cambiar en el futuro, para los fines de esta invención, levadura debe ser definida como se describe en Biology and Activities of Yeast (Skinner, F.A., Passmore, S.M., and Davenport, R.R., eds, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series No. 9, 1980).

ES 2 558 698 T3

[0131] En un aspecto más preferido incluso, la célula huésped de levadura es una célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o *Yarrowia*.

5 [0132] En un aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, o *Saccharomyces oviformis*.

En otro aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Kluyveromyces lactis*.

En otro aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Yarrowia lipolytica*.

10 [0133] En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica es una célula fúngica filamentosa. "Fúngica filamentosa" incluye todas formas filamentosas de la subdivisión Eumycota y Oomycota (como definido por Hawksworth et al., 1995, supra).

Los hongos filamentosos están generalmente caracterizados por el hecho de que una pared micelial compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano, y otros polisacáridos complejos.

15 Crecimiento vegetativo es por alargamiento hifal y catabolismo de carbono es estrictamente aeróbico.

En cambio, crecimiento vegetativo por levaduras tal como *Saccharomyces cerevisiae* es por injerto de un talo unicelular y catabolismo de carbono pueden ser fermentativos.

20 [0134] En un aspecto más preferido incluso, la célula huésped fúngica filamentosa es un *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Termonascus*, *Thielavia*, *Tolipocladium*, *Trametes*, o célula de trichoderma.

25 [0135] En un aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es un *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* o célula de *Aspergillus oryzae*.

En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es uno *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochromum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum* *Fusarium trichothecioides*, o célula de *Fusarium venenatum*.

30 En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una *Bjerkandera*, *adusta* *Ceriporiopsis*, *aneirina* *Ceriporiopsis*, *aneirina* *Ceriporiopsis*, *caregiea* *Ceriporiopsis*, *gilvescens* *Ceriporiopsis*, *pannocinta* *Ceriporiopsis*, *rivulosa* *Ceriporiopsis*, *subrufa* *Ceriporiopsis*, *subvermispora* *Chrysosporium*, *keratinophilum* *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium*, *tropicum* *Chrysosporium*, *merdarium* *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium*, *pannicola* *Chrysosporium*, *queenslandicum* *Chrysosporium*, *zonatum* *Coprinus cinereus*, *hirsutus* *Coriolus*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *radiata* *Phlebia*, *eryngii* *Pleurotus*, *Thielavia terrestris*, *villosa* *Trametes*, *versicolor* *Trametes*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, o célula de *Trichoderma viride*.

[0136] Células fúngicas se pueden transformar por un proceso que implica la formación de protoplasto, transformación de los protoplastos, y regeneración de de pared la celular conocida de por sí de una forma.

45 Procedimientos adecuados para transformación de *Aspergillus* y células huésped de trichoderma son descritas en EP238023 y Yelton et al., 1984, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81: 1470- 1474 .

Métodos adecuados para transformar especies de *Fusarium* son descritos por Malardier et al., 1989, gen 78: 147-156, y WO96/00787.

50 Levadura se puede transformar utilizando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, In Abelson, J.N. and Simon, M.I., editors, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Volume 194, pp 182-187, Academic Press, Inc., New York ; Ito et al., 1983, Journal of Bacteriology 153: 163 ; and Hinnen et al., 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 1920.

Métodos de producción

55 [0137] La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención que comprende (a) cultivo de una célula huésped recombinante bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.

60 [0138] La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención, que comprende: (a) cultivo de una célula de huésped recombinante bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido, donde la célula huésped comprende una secuencia de nucleótidos mutante con al menos una mutación en la

ES 2 558 698 T3

secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID NO:1, donde la secuencia de nucleótidos mutante codifica un polipéptido que comprende o consiste en el polipéptido maduro de SEC ID NO:2, y (b) recuperación del polipéptido.

5 [0139] En los métodos de producción de la presente invención, las células se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción del polipéptido usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula se puede cultivar por cultivo en matraz de agitación, fermentación de escala pequeña o a gran escala (incluyendo, continuo lote, lote alimentado, o fermentaciones de estado sólido) en el laboratorio o fermentadores industriales realizadas en un medio adecuado y bajo condiciones permitir al polipéptido a ser expresada y/o aislado.

10 El cultivo tiene lugar en un medio nutritivo adecuado comprendiendo fuentes de nitrógeno y carbono y sales inorgánicas, uso de procedimientos conocidos en la técnica. Medios adecuados están disponibles para proveedores comerciales o se pueden preparar según composiciones publicadas (por ejemplo, en catálogos de la recogida de cultivo de tipo americano).

Si el polipéptido se segrega en el medio nutritivo, el polipéptido se puede recuperar directamente del medio.

15 Si el polipéptido no es segregado, esto se puede recuperar de lisatos de célula.

[0140] Los polipéptidos se pueden detectar 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 esterasa, o desaparición de un sustrato de esterasa.

20 Por ejemplo, un ensayo de esterasa se puede utilizar para determinar la actividad del polipéptido como se describe en este caso.

[0141] El polipéptido resultante se puede recuperar por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido se puede recuperar del medio nutritivo por procedimientos convencionales incluyendo, pero no limitado a, centrifugado, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación, o precipitación.

25

[0142] Los polipéptidos de la presente invención se pueden purificar por una variedad de procedimientos conocida en la técnica incluyendo, pero no limitado a, cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, hidrofóbico cromatoenfoco, y exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectroenfoco preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación de sulfato amónico), SDS-PAGE, o extracción (ver, por ejemplo, rotein Purification, J.-C. Janson and Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989).

30

Plantas

35 [0143] 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 esterasa de la presente invención para expresar y producir el polipéptido en cantidades cobrables.

El polipéptido se puede recuperar de la planta o parte de planta.

40 Alternativamente, la planta o parte de planta con el polipéptido recombinante se puede utilizar como tal para mejorar la calidad de un alimento o pienso, por ejemplo, valor nutricional de mejora, palatabilidad, y propiedades reológicas, o a destruir un factor antinutritivo.

[0144] En una forma de realización particular, el polipéptido es previsto a las vacuolas de almacenamiento de endospermo en semillas.

45 Este puede ser obtenido sintetizándolo como un precursor con un péptido señal adecuado, ver Horvath et al en PNAS, Feb. 15, 2000, vol. 97, n° 4, p. 1914-1919.

[0145] La planta transgénica puede ser dicotiledóneo (un dicotiledóneo) o monocotiledóneo (una monocotiledónea) o variantes diseñadas de las mismas.

50 Ejemplos de plantas monocotiledóneas son hierbas, tales como poa de prados (poa pratense, Poa), hierba forrajera tal como Festuca, Lolium, césped templado, tal como Agrostis, y cereales, por ejemplo, trigo, avena, centeno, cebada, arroz, sorgo, triticale (híbrido estabilizado de trigo (Triticum) y centeno (Secale), y maíz (maíz).

[0146] Ejemplos de plantas dicotiledóneas son tabaco, leguminosas, tales como girasol (helianto), algodón (Gossypium), altramuces, patata, remolacha azucarera, guisante, judía y semilla de soja, y plantas crucíferas (Brassicaceae de familia), tal como coliflor, semilla de colza, y el organismo de modelo cercanamente relacionado Arabidopsis thaliana.

55 Plantas de bajo fitato como se describe por ejemplo en US patent n° 5,689,054 y US patent n° 6,111,168 son ejemplos de plantas diseñadas.

60 [0147] Ejemplos de partes de planta son tallo, callo, hojas, raíz, frutas, semillas, y tubérculos, al igual que los tejidos individuales que comprenden estas partes, por ejemplo epidermis, mesofilo, parénquima, tejidos vasculares, meristemas.

ES 2 558 698 T3

Compartimentos de célula vegetal también específica, tal como cloroplasto, apoplasto, mitocondria, vacuola, peroxisomas, y citoplasma se consideran a ser una parte de planta.

Además, cualquier célula vegetal, cualquier origen de tejido, se considera a ser una parte de planta.

5 Asimismo, partes de planta tales como tejidos específicos y células aislada para facilitar la utilización de la invención son también consideradas partes de planta, por ejemplo embriones, endospermas, aleurona y revestimientos de semilla.

[0148] También incluido dentro del campo de la presente invención son el descendiente de tales plantas, partes de planta y células vegetales.

10 [0149] La planta transgénica o célula vegetal que expresa un polipéptido de la presente invención se puede construir conforme a métodos conocidos en la técnica. Brevemente, la planta o célula vegetal se construye por incorporación uno o varios constructos que expresa que codifican un polipéptido de la presente invención en el genoma de huésped de planta y han de propagando la planta modificada resultante o célula vegetal en una planta transgénica o célula vegetal.

15 [0150] Convenientemente, el constructo de expresión es un constructo de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido de la presente invención operativamente enlazado con secuencias reguladoras apropiadas requeridas para la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos en la planta o parte de planta de elección.

20 Además, el constructo de expresión puede comprender una etiqueta seleccionable útil para identificación células huésped en que el constructo de expresión ha sido integrado y secuencias de ADN necesarias para introducción de la construcción en la planta en cuestión (el último depende del método de introducción de ADN para ser usado).

[0151] La elección de secuencias reguladoras, tal como promotor y secuencias terminadoras y opcionalmente señal o secuencias de tránsito se determinen, por ejemplo, basándose en cuando, donde, y como el polipéptido se desea a ser expresado.

25 Por ejemplo, la expresión del gen que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser constitutiva o inducible, o puede ser en desarrollo, fase o tejido específico, y el producto génico puede ser previsto a un compartimento de célula específica, tejido o parte de planta tales como semillas u hojas.

30 Secuencias reguladoras son, por ejemplo, descritas por Tague et al., 1988, *Plant Physiology* 86: 506.

[0152] Para expresión constitutiva, los siguientes promotores pueden ser utilizados: el 35S-CaMV promotor (Franck et al., 1980, célula 21: 285-294), la ubiquitina-1 de maíz (Christensen ah, Sharrock RA y Quail 1992).

35 Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation), o el promotor de actina de arroz 1 (*Plant Mo. Biol.* 18,675-689.; W de Zhang, McElroi D. y Wu R 1991, *Analysis of riceAct1 5' region activity in transgenic rice plants.* *Plant Cell* 3,1155-1165).

Promotores órgano-específicos pueden ser, por ejemplo, un promotor de tejidos sumidero de almacenamiento tales como semillas, tubérculos de patata, y frutas (Edwards & Coruzzi, 1990, *Ana. Rev. Ganeta.* 24: 275-303), o de tejidos sumidero metabólicos tales como meristemas (Ito et al., 1994, *Plant Mol. Biol.* 24: 863-878), un promotor específico de semilla como la glutelina, prolamina, globulina, o promotor de albúmina de arroz (Wu et al., 1998, *Plant and Cell Physiology* 39: 885-889), un promotor de Vicia faba de la legúmina B4 y el gen de proteína de semilla desconocida de Vicia faba (Conrado et al., 1998, *Journal of Plant Physiology* 152: 708-711), un promotor de una proteína del cuerpo de aceite de semilla (Chen et al., 1998, *Plant and Cell Physiology* 39: 935-941), la proteína de almacenamiento napA promotor de Brassica napus, o cualquier otro promotor específico de semilla conocido en la técnica, por ejemplo, como se describe en WO 91/14772.

45 Además, el promotor puede ser un promotor específico de hoja tal como el promotor de rbcS de arroz o tomate (Kyoizuka et al., 1993, *Plant Physiology* 102: 991-1000, el promotor de gen de metiltransferasa de adenina de virus de chlorella (Mitra e Higgins, 1994, *Plant Molecular Biology* 26: 85-93), o el aldP promotor de gen de arroz (Kagaya et al., 1995, *Molecular and General Genetics* 248: 668-674), o un promotor inducible dañado como la patata pin2 promotor (Xu et al., 1993, *Plant Molecular Biology* 22: 573-588).

50 Asimismo, el promotor puede ser inducible por tratamientos abióticos tal como temperatura, sequía o alteraciones en la salinidad o inducibles por sustancias exógenamente aplicadas que activan el promotor, por ejemplo etanol, estrógenos, hormonas de planta como etileno, ácido abscísico, ácido giberélico, y/o metales pesados.

[0153] Un elemento intensificador del promotor también se puede usar para conseguir expresión más alta de la enzima en la planta.

55 Por ejemplo, el elemento intensificador del promotor puede ser un intrón que es colocado entre el promotor y la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención.

Por ejemplo, Xu et al., 1993, supra revelan el uso del primer intrón del gen de actina de arroz 1 a mejorar expresión.

60 [0154] Y además, el uso de codón se puede optimizar para las especies de planta en cuestión para mejorar expresión (ver Horvath et al referido por encima).

ES 2 558 698 T3

[0155] El gen marcador seleccionable y cualquiera de las otras partes del constructo de expresión se pueden elegir de aquellos disponibles en la técnica.

5 [0156] El constructo de ácidos nucleicos se incorpora en el genoma de planta según técnicas convencionales conocido en la técnica, incluyendo transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación mediada de virus, microinyección, bombardeo de partícula, transformación biolística, y electroporación (Gasser et al., 1990, *Science* 244: 1293; Potrykus, 1990, *Bio/Technology* 8: 535; Shimamoto et al., 1989, *Nature* 338: 274).

10 [0157] Actualmente, transferencia de gen mediado por tumefaciens de *Agrobacterium* es el método de elección para generar dicotiledóneas transgénicas (para una revisión, ver Hooykas y Schilperoort, 1992, *Plant Molecular Biology* 19: 15-38), y esto puede también usarse para monocotiledóneas de transformación, aunque otros métodos de transformación son más frecuentemente usados para estas plantas.

15 Actualmente, el método de elección para generar monocotiledóneas transgénicas, complementación del método de *Agrobacterium*, es bombardeo de partícula (oro microscópico o partículas de tungsteno recubierta con la transformación ADN) de callos embrionarios o desarrollo de embriones (Christou, 1992, *Plant Journal* 2: 275-281 ; Shimamoto, 1994, *Current Opinion Biotechnology* 5: 158-162 ; Vasil et al., 1992, *Bio/Technology* 10: 667-674).

Un método alternativo para transformación de monocotiledóneas se basa en transformación de protoplasto como se describe por Omirulles et al., 1993, *Plant Molecular Biology* 21: 415-428.

20 [0158] Transformación siguiente, los transformantes que han incorporado el constructo de expresión se seleccionan y regeneran en enteras planta según métodos bien conocido en la técnica. frecuentemente el procedimiento de transformación se diseña para la la eliminación selectiva de genes de selección bien durante regeneración o en las siguientes generaciones usando por ejemplo cotransformación con dos Constructos de t-ADN separado o escisión específica de sitio del gen de selección por una recombinasa específica.

25 [0159] La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención que comprende (a) cultivo una planta transgénica o una célula vegetal que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con actividad enzimática de la presente invención bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.

30 Composiciones

[0160] En otro aspecto ulterior, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden un polipéptido de la presente invención.

35 [0161] Las composiciones de polipéptido se pueden preparar conforme a métodos conocidos en la técnica y pueden ser en forma de un líquido o una composición seca.

Por ejemplo, la composición de polipéptido puede ser en forma de un granulado o un microgranulado.

40 El polipéptido a ser incluido en la composición se puede estabilizar conforme a métodos conocidos en la técnica.

[0162] Ejemplos son dados por debajo de usos preferidos de los polipéptidos o composiciones de polipéptido de la invención.

45 Pienso para animales

[0163] La presente invención es también dirigida a métodos para uso de los polipéptidos con actividad de esterasa en el pienso para animales, al igual que a alimentar composiciones y aditivos alimenticios comprendiendo los polipéptidos de la invención.

50 [0164] El término animal incluye todos los animales, incluyendo seres humanos.

Ejemplos de animales son no rumiantes, y rumiantes.

Animales rumiantes incluyen, por ejemplo, animales tales como oveja, cabra, y ganado bovino, por ejemplo vaca tal como ganado bovino para carne y vacas de productos lácteos.

En una forma de realización particular, el animal es un animal no rumiante.

55 Animales no rumiantes incluyen animales monogástricos, por ejemplo cerdo o puerco (incluyendo, pero no limitado a, lechones, cerdos en crecimiento, y cerdas); aves tales como pavos, patos y pollos (incluyendo pero no limitado a pollos para asar, estratos); pescado (incluyendo pero no limitado a salmón, trucha, tilapia, siluro y carpa); y crustáceos (incluyendo pero no limitado a gamba y cigala).

60 [0165] El término pienso o composición alimentaria significa cualquier compuesto, preparación, mezcla, o composición adecuada para, o destinado para toma por un animal.

ES 2 558 698 T3

- [0166] En el uso según la invención la esterasa puede alimentar al animal antes, después, o simultáneamente con la dieta.
Lo último es preferido.
- 5 [0167] En una forma de realización particular, la esterasa, en la forma donde se añade al pienso, o cuando es incluida en un aditivo de pienso, es bien definido.
Bien definido significa que la preparación de esterasa es al menos 50% puro como determinado por cromatografía de exclusión de tamaño (véase ejemplo 12 de WO01/58275).
En otras formas de realización particulares la preparación de esterasa es al menos 60, 70, 80, 85, 88, 90, 92, 94, o al
10 menos 95% puro como determinado por este método.
- [0168] Una preparación bien definida de esterasa es ventajosa.
Por ejemplo, es mucho más fácil dosificar correctamente una esterasa al pienso que es esencialmente libre de interferente o contaminante otras esterases.
- 15 El término dosificar correctamente se refiere en particular al objetivo de obtener resultados consistentes y constantes, y la capacidad de dosificación de optimización basada en el efecto deseado.
- [0169] Para uso en el pienso para animales, no obstante, la esterasa no necesita ser tan pura; esta puede por ejemplo incluir otras enzimas, en cuyo caso esto podría denominarse una preparación de esterasa.
- 20 [0170] La preparación de esterasa puede ser (a) adicionada directamente al pienso (o usada directamente en un proceso de tratamiento de proteínas), o (b) se puede usar en la producción de una o varias composiciones intermedias tales como aditivos alimenticios o premezclas que es posteriormente añadida a la alimentación (o usada en un proceso de tratamiento).
- 25 El grado de pureza anteriormente descrito se refiere a la pureza de la preparación de esterasa original, si usado según (a) o (b) por encima.
- [0171] Preparaciones de esterasa con purezas de este orden de magnitud son en particular métodos recombinantes de uso obtenible de producción, mientras que ellos no son tan fácilmente obtenidos y también sujetos a una variación entre
30 lotes mucho más alta cuando la esterasa se produce por métodos de fermentación tradicional.
- [0172] Tal preparación de esterasa puede por supuesto ser mezclada con otras enzimas.
- [0173] La esterasa se puede añadir a la alimentación en cualquier forma, sea como una esterasa relativamente pura, o en la mezcla con otros componentes destinados para adición a pienso para animales, es decir en forma de aditivos de
35 pienso, tal como las premezclas denominadas para pienso para animales.
- [0174] En otro aspecto la presente invención se refiere a composiciones para usar en el pienso para animales, tal como pienso para animales, y aditivos de pienso, por ejemplo premezclas.
- 40 [0175] Además de la esterasa de la invención, los aditivos de pienso de la invención contienen al menos una vitamina liposoluble, y/o al menos una vitamina soluble en agua, y/o al menos un oligoelemento, y/o al menos un macromineral.
- [0176] Además, ingredientes de aditivo de pienso opcionales son agentes colorantes, por ejemplo carotenoides tales como beta-caroteno, astaxantina, y luteína; compuestos de aroma; estabilizadores; péptidos antimicrobianos; ácidos grasos poliinsaturados; especies generadores de oxígeno reactivo; y/o a mínimo una otra enzima seleccionada de entre
45 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 (EC 3,1,4,3); fosfolipasa D (EC 3,1,4,4); amilasa tal como, por ejemplo, alfa-amilasa (EC 3,2,1,1); glucanasa beta (EC 3,2,1,4 o EC 3,2,1,6) y/o arabinofuranosidasa (EC 3,2,1,55)..
- 50 [0177] En una forma de realización particular estas otras enzimas son bien definido (como arriba definido para preparaciones de esterasa).
- [0178] Ejemplos de péptidos antimicrobianos (AMP's) son CAP18, Leucocin un, Tritrpticin, Protegrin-1, Thanatin, defensina, lactoferrina, lactoferricina, y ovispirina tal como novispirina (Robert Lehrer, 2000), plectasinas, y estatinas, con los compuestos y polipéptidos descritos en WO03/044049 y WO03/048148, al igual que variantes o fragmentos del anterior que retienen actividad antimicrobiana.
- 55 [0179] Ejemplos de ácidos grasos poliinsaturados son C18; C20 y C22 ácidos grasos poliinsaturados, tal como ácido araquidónico, ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentanoico y ácido gamma-linolénico.
- 60

ES 2 558 698 T3

[0180] Ejemplos de especies generadoras de oxígeno reactivo son productos químicos tal como perborato, persulfato, o percarbonato; y enzimas tal como una oxidasa, una oxigenasa o una sintetasa.

5 [0181] Vitaminas normalmente grasas e hidrosolubles, al igual que oligoelementos forman parte de una así llamada premezcla destinada a la adición a la alimentación, mientras que macrominerales son normalmente separadamente añadidos a la alimentación.

Cualquiera de estos tipos de composición, cuando enriquecido con una esterasa de la invención, es un aditivo de pienso de la invención.

10 [0182] En una forma de realización particular, el aditivo de pienso de la invención está destinado a ser incluido (o prescrito como teniendo que ser incluido) en dietas para animales o alimentación a niveles de 0,005 a 10%, particularmente 0,01 a 5%, más particularmente 0,02 a 2% e incluso más particularmente 0,2 a 1% (% significando g aditivo por 100 g alimentación).

Esto es así en particular para premezclas.

15

[0183] Lo siguiente son listas no exclusivas de ejemplos de estos componentes:

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

20

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

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

Ejemplos de macrominerales son calcio, fósforo y sodio.

25 [0184] Los requisitos nutricionales de estos componentes (ejemplificados con ave y lechones/cerdos) se enumeran en la tabla un de WO01/58275.

Requisito nutricional significa que estos componentes deberían ser proporcionados en la dieta en las concentraciones indicadas.

30 [0185] En la alternativa, el aditivo de pienso de la invención comprende al menos uno de los componentes individuales específico en la tabla A de WO01/58275. Al menos un medio cualquiera de, uno o varios de, uno, o dos, o tres, o cuatro etcétera hasta todos los trece, o hasta todos los quince componentes individuales.

Más específicamente, este al menos un componente individual se incluye en el aditivo de la invención en tal cantidad como para proporcionar una concentración en pienso en la gama indicada en la columna cuatro, o columna cinco, o columna seis de Tabla A.

35

[0186] La presente invención también se refiere a composiciones de pienso para animales.

Composiciones de pienso para animales o dietas tienen un contenido relativamente alto de proteína.

Dietas de cerdo y ave se pueden caracterizar como indicado en la Tabla B de WO01/58275, columnas 2-3.

40 Dietas de pescado se pueden caracterizar como indicado 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.

[0187] WO01/58275 corresponde a Patente US nº 6,960,462 que es por la presente incorporada por referencia.

45 [0188] Una composición de pienso para animales según la invención tiene un contenido bruto de proteína de 50- 800 g/kg, y comprende además al menos una esterasa como reivindicada aquí.

[0189] Además, o en la alternativa (al contenido bruto de proteína indicado por encima), la composición de pienso 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.

50

[0190] En formas de realización particulares, el contenido de energía metabolizable, proteína cruda, calcio, fósforo, metionina, metionina más cisteína, y/o lisina está dentro de cualquiera de las gamas 2, 3,4 o 5 en la Tabla B de WO01/58275 (R. 2-5).

55

[0191] Proteína cruda se calcula como nitrógeno (N) multiplicada 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 de Kjeldahl (A.O.A.C., 1984, Official Methods of Analysis 14th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington DC).

60

ES 2 558 698 T3

[0192] Energía metabolizable se puede calcular basándose en NRC publication Nutrient requirements in swine, ninth revised edition 1988, subcommittee on swine nutrition, committee on animal nutrition, board of agriculture, national research council.

5 National Academy Press, Washington, D.C., pp. 2-6, and the 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 .

10 [0193] El contenido dietético de calcio, fósforo disponible y aminoácidos en dietas para animales completas es calculado basándose en tablas de alimentación tales como eevoedertabel 1997, gegevens over chemische samenstelling, verteerbaarheid en voederwaarde van voedermiddelen, Central Veevoederbureau, Runderweg 6, 8219 pk Lelystad.
ISBN 90-72839-13-7.

15 [0194] Dietas para animales pueden por ejemplo ser fabricada como pienso de macerado (no granulado) o pienso granulado.
Típicamente, los materiales de pienso molidos se mezclan y cantidades suficientes de vitaminas esenciales y minerales se agregan según las especificaciones para las especies en cuestión.
Enzimas se pueden adicionar como formulaciones enzimáticas sólidas o líquidas.
20 Por ejemplo, una formulación enzimática sólida es típicamente adicionada antes o durante el paso de mezcla; y una preparación enzimática líquida es típicamente adicionada después del paso de granulación.
La enzima también se puede incorporar en un aditivo de pienso o premezcla.

25 [0195] La concentración enzimática final en la dieta está en la gama de 0,01-200 mg proteína enzimática por kg dieta, por ejemplo en el rango de 0,2-30 mg, preferiblemente 0,5 a 1,5 mg proteína enzimática por kg dieta animal.
Para la composición enzimática que comprende xilanasas y esterases, la concentración enzimática final será típicamente 0,5 a 1 mg por kg dieta animal.

30 [0196] La esterasa debería por supuesto aplicarse en una cantidad eficaz, es decir en una cantidad adecuada para mejorar la solubilización y/o mejorar valor nutricional de pienso.
Es actualmente contemplado que la enzima se administra en una o varias de las siguientes cantidades (dosificación varía): 0,01-200, 0,01-100, 0,5-100, 1-50, 5-100, 10-100, 0,05-50; o 0,10-10 - todas estas gamas estando en mg proteína de esterasa por kg pienso (ppm).

35 [0197] Para determinación mg proteína de esterasa por kg pienso, la esterasa es purificada de la composición alimentaria, y la actividad específica de la esterasa purificada es determinada usando un ensayo pertinente (ver bajo determinación de esterasa).
La actividad de esterasa de la composición alimentaria como tal es también determinado usando el mismo ensayo, y basándose en estas dos determinaciones, la dosificación en mg proteína de esterasa por kg pienso es calculada.

40 [0198] Los mismos principios se aplican para determinación mg proteína de esterasa en aditivos alimenticios.
Por supuesto, si una muestra es disponible de la esterasa usada para preparar el aditivo de pienso o el pienso, la actividad específica es determinada de esta muestra (no hay necesidad de purificar la esterasa de la composición alimentaria o el aditivo).

45 Ejemplos

Reactivos, medios, y equipo

50 [0199] Reactivos: a menos que especificado lo contrario, los productos químicos usados fueron productos comerciales de al menos calidad reactiva.

Sustratos de pNP:

PNPB: butirato de p-nitrofenilo (Sigma N9876),
PNPA: acetato de p-nitrofenilo (Sigma N8130),
PNPP: palmitato de p-nitrofenilo (Sigma N2752),
55 PNNAG: p-nitrofenilo N-Acetil-β-D-Glucosaminide (Sigma N9376).

EDTA (Gibco BRL nº de catálogo. 15576-028)

IPTG (Promega, Cat. No.V3951)

X-gal (Promega, Cat. No. V3941)

60 Sal de sodio de ampicilina (GIBCOL nº de catálogo. 11593-019)

Agarosa LMP (Promega, nº de catálogo. V2111)

ES 2 558 698 T3

BETEB: ácido tereftálico bis(2-hidroxietil)éster dibenzoato es aquí abreviado como BETEB (benzoil-etileno-tereftálico-ethelene-benzoato).

Fue obtenido a partir de ácido tereftálico bis(2-hydroxyethyl) ácido benzoico y éster.

5 Medios:

[0200]

Medio líquido LB: a 950 ml de desionizado H₂O, añadir: 10 g bacto-triptona, 5 g extracto de levadura de bacto, 10 g NaCl.

10 Sacudir hasta que los solutos se hayan disuelto.

Ajustar el pH a 7,0 con 5 N NaOH (~0.2ml)). Ajustar el volumen de la solución a 1 litro con desionizado H₂O. Esterilizar por autoclave durante 20 minutos a 15lb/sq. in. en el ciclo líquido.

Placas LB con ampicilina/IPTG/X-Gal: añadir 15 g agar a 1 litro de medio LB.

15 Añadir ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml, luego suplemento con 0,5 mM IPTG y 80 µg/ml X-gal y echar las placas.

Medio líquido SOC: 2% triptona, 0,5% extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucosa

Búfer TAE: 0.04 M Tris-acetato, 0,001 M EDTA

1% gel de agarosa LMP: añadir 1g agarosa LMP en 100 ml 1X búfer TAE.

20 YS medio: a 1 agua de litro añadir: 10 g peptona, 10 g extracto de levadura, 5 g glucosa, 5 g K₂HPO₄, 1 g MgSO₄ .7H₂O, 20 ml aceite de oliva.

MD medio: 1,34% YNB, 4x10⁻⁵% biotina, 2% dextrosa

BMGY (tamponado Glycerol-complex medio): 1% extracto de levadura, 2% peptona, 100 mM fosfato potásico (pH6.0), 1,34% YNB, 4x10⁻⁵% biotina, 1% glicerol

25 BMMY (tamponado Methanol-complex medio) 1% extracto de levadura, 2% peptona, 100 mM fosfato potásico (pH 6.0), 1,34% YNB, 4x10⁻⁵% biotina, 0,5% metanol.

Equipo, incluyendo varios kits:

30 [0201]

5 Membrana de k (Millipore BIOMAX-5,13442AM)

0,45 µm filtro (Nalgene 190-2545)

0,45 µm filtros policarbonatos (Sartorius)

35 Q sefarosa FF columna (Amersham Pharmacia 17-0510-01)

Superdex75 columna (Amersham Pharmacia 17-1047-01)

Péptido de Superdex PE (7.5 x 300 mm) columna de gelfiltración (Global)

Gel IEF (Amersham Pharmacia 80-1124-80)

Comodidad de termomezclador (Eppendorf)

Espectrofotómetro DU7500 (Beckman)

40 GeneAmp sistema de PCR 9700(PE)

Vac Jr. Colector de vacío de laboratorio (Promega, nº de catálogo A7660)

BioRad GenePulser II

Equipo Mini de planta de RNeasi (50) (QIAGEN; Cat.No.74904)

DNeasi equipo Mini de planta (50) (QIAGEN; Cat.No.69104)

45 3' RACE Kit (GIBCO, Cat.No.18373-019) incluyendo cebador de adaptador, y AUAP

DNTP mezcla (100 mM, Promega, nº de catálogo. U1330)

Sistema de polimerasa TaqADN (Promega, nº de catálogo. M1661) incluyendo búfer PCR (200 mM Tris- HCl (pH 8,4), 500 mM KCl)

PCR Preps sistema de purificación de ADN (Promega, nº de catálogo. A7170)

50 Sistema de vector pGEM-T (Promega, nº de catálogo.

A3600) incluyendo T4 DNA-ligasa 2XBuffer

JM109 células competentes de eficiencia alta (Promega, nº de catálogo. L1001)

ElectroMax™ DH10B célula competente (Invitrogen, nº de catálogo. 18290-015)

Minipreps sistema de purificación de ADN (Promega, nº de catálogo. A7100)

55 BigDie kit de reacción preparada de secuenciación de ciclo terminador (PE Applied Biosystems, nº de catálogo. 4303149)

DNA Walking™ SpeedUp Kit (Seegene, nº de catálogo. #K1502)

ABI Prism 377 secuenciador de ADN (PE)

Sistema de polimerasa de DNA Pfu (Promega, nº de catálogo. M7741)

60 SnaB I (Promega R6791)

Not I (Promega R6431)

Bgl II (Promega R6071)

ES 2 558 698 T3

Ejemplo 1: ensayos de esterasa

Ensayo de placa de agarosa:

5

[0202] Placas de agarosa que contienen 1% agarosa en el búfer de citrato de fosfato pH 8,5, 0,1% BETEB; 20 µl muestra fue aplicada en d = 4 mm agujeros en las placas de agarosa con sustrato BETEB, incubación a 45°C durante 12-16 horas.

Actividad enzimática fue identificada por halos limpios.

10

Ensayo de tubo de Eppendorf BETEB

[0203] Una solución de 0,08% del sustrato BETEB se suspende en Tri-HCl de protección pH 8,5 mientras se agita (en cambio, para el perfil de pH parte de ejemplo 4, el sistema de protección pH 3 a pH 11 fue usado).

15

La solución se distribuye mientras se agita a tubo de Eppendorf (100 µl a cada pozo), 30 µl muestra enzimática se añade y las placas se incuban en un termomezclador de Eppendorf durante 30 minutos a 50°C y 1200 r.p.m.

Muestra de enzima desnaturalizada (100°C de ebullición durante 20 min) se usa como una forma preliminar.

Después de la incubación de la reacción se detiene por transferencia el tubo sobre hielo y luego centrifugada durante 10 minutos a 10000 r.p.m. y 4°C. 60 µl de sobrenadante se transfiere a una placa de microtitulación y la absorbancia a 230 nm es medido utilizando un lector de microplacas BioRad.

20

Isoelectroenfoco:

[0204] Isoelectroenfoco se efectuó en placas pH 3,5-9,5 Ampholine PAG prefabricadas (Pharmacia; Suecia) según las instrucciones del fabricante.

25

Las muestras fueron aplicadas por triplicado y después del electroforesis el gel fue dividido en tres.

Una capa que contiene 1% agarosa y 0,1% BETEB en de protección pH 8,5 fue vertido sobre cada parte de gel.

Incubación a 45°C durante 12-16 horas.

Actividad enzimática y µl de proteína enzimática fue identificada por zonas limpias.

30

Determinación de actividad de esterasa en el sustrato pNPB

[0205] Actividad de esterasa es determinada usando el p-nitrofenilo butirato como sustrato.

35

La preparación enzimática se diluye para proporcionar menos que 15% conversión de butirato de p-nitrofenilo por fabricación de una dilución inicial en un tubo de microcentrifugadora 1,5 ml con 50 mM acetato sódico pH 5,0 seguida de diluciones en serie de 2-plegamiento con 50 mM acetato sódico pH 5,0.

Luego 100 µl partes alícuotas de la enzima diluida se transfieren por pocillos de una placa 96-pocillos.

[0206] Una solución madre de butirato de p-nitrofenilo está hecha por butirato de p-nitrofenilo de disolución en el dimetilsulfóxido (DMSO) para constituir un 0,1 M solución.

40

Antes del ensayo, una muestra de la solución madre es diluida 100 veces en 50 mM acetato sódico pH 5,0 para hacer un 1 mM solución.

Un 100 µl volumen de 1 mM butirato de p-nitrofenilo se mezcla con cada dilución de la enzima y luego incubado a 25°C durante 10 minutos.

45

Sustrato solo, enzima sola, y búfer solo son puestos en marcha como controles. Soluciones estándar de p-nitrofenol de 0,25, 0,2, 0,1, 0,05, y 0,02 mM se preparan por dilución de un 10 mM solución madre en 50 mM acetato sódico pH 5,0.

A 10 minutos, 50 µl de 1,0 M Tris-HCl pH 8,0 búfer se añade a cada pocillo (incluyendo muestras, control de sustrato, control enzimático, control reactivo, y estándares), mezclado, y la absorbancia a 405 nm inmediatamente medido en un lector de placa de microtitulación (BioRad).

50

Una unidad de actividad de esterasa es definida como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 µmol de anión de p-nitrofenolato por minuto a pH 5,25°C.

Ejemplo 2: cultivo de cepa Myrothecium sp.

55

[0207] Para inoculación, la cepa Myrothecium de especies fúngicas sp. fue cultivada en YS placa de agar (peptona 10 g/L, extracto de levadura 10 g/L, glucosa 5 g/L, K₂ HPO₄ 5 g/L, MgSO₄ .7H₂ O 1 g/L, agar 20 g/L, pH 6,5) a 25°C durante 7 días y luego almacenada a 4°C antes de usada para inoculación de matraz de agitación.

Para producción de enzima cruda, la cepa fue inoculada en 500 ml matraz de agitación con 50 ml YS medio (peptona 10 g/L, extracto de levadura 10 g/L, glucosa 5 g/L, K₂ HPO₄ 5 g/L, MgSO₄ .7H₂ O 1 g/L, aceite de oliva, pH 6.5) e incubado bajo 160 r.p.m. y 25°C durante 7 días.

60

El caldo de cultivo fue cosechado por centrifugado (4000 r.p.m. durante 20 minutos a 4°C).

ES 2 558 698 T3

Ejemplo 3: purificación de la cepa esterasa de *Myrothecium* sp.

[0208] 1200 ml sobrenadante del Ejemplo 2 fue precipitado con sulfato amónico (80% saturación) y redisolto en 40 ml 25 mM Tris-HCl, pH 7,4 búfer.

5 La solución resultante fue dializada contra 25 mM búfer Tris-HCl (pH 8,0) para eliminar sales. El volumen final fue 50 ml.

La solución enzimática concentrada fue cargada en una columna Mono Q de intercambio aniónico equilibrada con 25 mM búfer Tris-HCl, pH 8,0, y luego las proteínas fueron eluidas con un gradiente lineal de 0-1 M NaCl.

10 El efluente de la columna fue controlado para absorción a 280 nm y fracciones fueron evaluadas para actividad enzimática por ensayo de placa BETEB a pH 8,5.

Las fracciones activas fueron agrupadas y concentradas, y luego aplican la fracción concentrada anterior en a una columna de filtración en gel de Superdex 75 que ha sido previamente equilibrada con 25 mM búfer Tris-HCl, pH 8,0, y eluen las proteínas con el mismo búfer., Tras el ensayo enzimático las fracciones activas fueron agrupadas, concentradas nuevamente y dializadas contra 20 mM búfer de acetato sódico, pH 5,0.

15 Las muestras dializadas fueron aplicadas a una columna tercera, Mono Q equilibradas con 20 mM búfer de acetato sódico, pH 5,0.

Las proteínas fueron eluidas con un gradiente lineal de 0-1 M NaCl.

Finalmente, las fracciones activas fueron agrupadas y usadas para caracterización.

20 [0209] Después de los procedimientos de purificación anteriores, muestras fueron recogidas y controladas para tanto actividad (ensayo de placa de agarosa y técnica overlay con BETEB) como también pureza (gel SDS PAGE e IEF), luego usados para caracterización.

[0210] En SDS-Page, 4 bandas proteicas alrededor del peso molecular 60 KDa fueron vistas y supuestas para ser la proteína enzimática correspondiente.

25 Estas bandas proteicas fueron electrotransferidas y las secuencias N-terminal fueron determinadas.

Se ha observado que estas 4 bandas proteicas tienen las mismas secuencias N- terminales: SCSPEVFSSVGIPKGEVL.

[0211] Capa de sustrato BETEB después de utilizar gel IEF mostró que hubo una única fracción activa con μ l alrededor de pH 3,5.

30 La misma secuencia N-terminal y el mismo μ l llevaron la conclusión que éstas son la misma proteína.

Ejemplo 4: caracterización de la cepa esterasa de *Myrothecium* sp.

35 Perfil de temperatura

[0212] La relación entre temperatura y actividad enzimática fue evaluada utilizando tanto ensayos P- NPB como BETEB.

40 [0213] La enzima es activa en una gama amplia de temperaturas de 20-70°C y parece tener su temperatura óptima alrededor de 50-60°C.

Perfil pH

45 [0214] La relación entre pH y actividad enzimática fue evaluada utilizando tanto el ensayo p-NPB como BETEB de ejemplo 1 con el sistema de protección pH 3 a pH 11.

[0215] La enzima parece tener actividad en un ancho rango de pH de pH 4-10.

El pH óptimo es alrededor de 8-9.

50 Estabilidad de temperatura

[0216] Para mediciones de estabilidad de temperatura, la enzima fue incubada a 60 grados durante tiempos diferentes (0, 1, 3, 4, 6, 7, 14, 24 horas), luego la actividad enzimática fue evaluada usando pNPB como sustrato a pH 8,5.

55 [0217] La enzima parece ser estable.

Todavía tiene alrededor de 30% actividad de residuo incluso tras incubación 7 horas a 60 grados.

Especificidad de sustrato pNP

60 [0218] La especificidad de sustrato de la enzima fue evaluada utilizando sustratos diferentes que incluyen unos sustratos de pNP (butirato de p-nitrofenilo (Sigma N9876), acetato de p-nitrofenilo (Sigma N8130), palmitato de p-nitrofenilo (Sigma N2752), p-nitrofenilo N-Acetil- β -D-Glucosaminide (Sigma N9376), tanino, BETEB.

ES 2 558 698 T3

El resultado fue mostrado en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1. Comparación de especificidad de sustrato de la enzima de la presente invención

5	Sustrato	Enzima de la presente invención
	Tanino	-
	BETEB	+
10	pNPP	-
	pNPB	+
	pNPA	-
	pNNAG	+

15 [0219] De la tabla de arriba, podemos saber que las enzimas de la presente invención tienen actividad de esterasa. Es activo en el sustrato pNPB y sustrato BETEB.

Secuenciación N-terminal

20 [0220] La secuencia de aminoácidos N-terminal de la enzima fue: SSCSPEVFSSVGIPKGEVL (SEC ID NO:3).

Ejemplo 5: clonación del gen que codifica la cepa de enzima de *Myrothecium* sp.

Cepa fúngica y su crecimiento

25 [0221] Cepa de *Myrothecium* sp. fue cultivada a 25°C, 165 r.p.m. durante 7 días en YS medio. El micelio fue cosechado por centrifugado a 7000 r.p.m. durante 30 minutos. El micelio cosechado fue almacenado a -80°C antes del uso para extracción de ARN.

30 Extracción de ARN total

[0222] ARN total fue extraído de 100 mg micelio que utiliza el RNeasy Mini Kit.

Cebadores degenerados

35 [0223] Los siguientes cebadores degenerados fueron diseñados basados en parte en la secuencia de aminoácidos N-terminal, SSCSPEVFSSVGIPKGEVL: 5' cebador degenerado final KD60II (gTC ggC AT(T/C) CCN AA(A/g) ggN gA) (SEC ID NO:4) y usado para amplificación de PCR.

40 Clonación del gen enzimático:

[0224] El 3' RACE Kit fue usado para sintetizar el ADNc de cepa *Myrothecium* sp. Aproximadamente 5 mg ARN total fue usado como modelo y el cebador de adaptador fue usado para sintetizar la primera cadena de ADNc.

45 Luego el ADNc fue amplificado por PCR utilizando los anteriores cebadores degenerados. El sistema de reacción por PCR y condiciones fueron de la siguiente manera:

10 x búfer PCR	5 µl
25 mM MgCl ₂	3 µl
10 mM dNTP mezcla	1 µl
5'Cebador (KD60II; 10 µM)	1 µl
AUAP (10 µM)	1 µl
Taq DNA-polimerasa	0,5 µl
Síntesis de ADNc reactivo	2 µl
Añadir agua autoclavada destilada a	50 µl

Condiciones RCP

50 [0225] Programa RCP: 94°C durante 3 min; 30 ciclos de 94°C durante 40 segundos, 55°C durante 40 segundos y 72°C durante 1,5 min; extensión final a 72°C durante 10 min

ES 2 558 698 T3

[0226] Tras usar la amplificación RT-PCR usando el kit 3' RACE (Rapid Amplification of cDNA End) donde un cebador específico final 3' (AUAP) se usa, análisis de gel del producto PCR reveló una banda específica que corresponde con un fragmento de aproximadamente 1600 par de bases se obtuvo.

5 Los productos fueron recuperados de 1% gel de agarosa LMP, purificados por incubación en un 70°C baño, seguido de uso del PCR Preps sistema de purificación de ADN.

Las concentraciones de productos purificados fueron determinadas por medición de la absorbancia de A260 y A280 en un espectrofotómetro.

Luego estos fragmentos purificados fueron ligados al Vector pGEM-T que utiliza el Promega Kit correspondiente:

T4 DNA-ligasa 2XBúfer	1 µl
Vector pGEM-T (50 ng)	1 µl
Producto PCR	40 ng
T4 DNA-ligasa (3 Weiss unidades/µl)	1 µl
DH ₂ O a un volumen final de	10 µl

10

[0227] Las reacciones fueron incubadas durante toda la noche a 4°C. 2-4 µl de los productos de ligamiento fueron transformados en 50 µl células competentes de eficiencia alta JM109 por el método "golpe de calor" (J. Sambrook, E.F.Fritsch, T.Maniatis (1989) Molecular Cloning 1.74, 1.84).

15

Cultivos de transformación fueron placados sobre placas LB con ampicilina/IPTG/X-Gal, y estas placas fueron incubadas durante toda la noche a 37°C.

Clones recombinantes fueron identificados por selección de color en placas indicadoras y selección de colonia PCR de la siguiente manera:

Sistema de colonia PCR:

20

[0228]

10 x búfer PCR	5 µl
25 mM MgCl ₂	3 µl
10 mM dNTP mezcla	1 µl
5'Cebador (10 µM, KD6011)	2 µl
AUAP (10 µM)	2 µl
Polimerasa TaqADN	0,5 µl
Añadir agua autoclavada destilada a	50 µl

25

[0229] Bañar una colonia blanca con una punta y pipetear la colonia en la mezcla RCP como el modelo.

Condiciones RCP

[0230] Programa RCP: 94°C durante 3 min; 30 ciclos de 94°C durante 40 segundos, 55°C durante 40 segundos y 72°C durante 1,5 min; extensión final a 72°C durante 10 min.

30

[0231] Los clones positivos fueron inoculados en 3 ml de medio líquido de ampicilina LB e incubados durante toda la noche a 37°C con agitación (aproximadamente 250 r.p.m.).

Células fueron granuladas por centrifugado durante 5 min a 10,000 x g, y muestras plásmidas fueron preparadas a partir del granulado celular usando Minipreps DNA Purification System.

35

Finalmente, los plásmidos fueron ordenados utilizando elBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit y el secuenciador ABI377.

La reacción de secuenciación fue de la siguiente manera:

Mezcla de reacción preparada terminadora	8 µl
ADN plásmido	1,0-1,5 µl
Cebador	3,2 pmol
DH ₂ O a un volumen final de	10 µl

40

[0232] Análisis de secuencias de la clon de cDNA mostró que secuencia contenía la región de codificación para el péptido maduro.

Clonación del 5' extremo del gen objetivo

ES 2 558 698 T3

[0233] Para obtener la secuencia de longitud total del gen objetivo, cebadores nuevos durante clonación de 5' extremo usando DNA Walking™ SpeedUp Kit (See Gene, Cat. No. #K1502) fueron diseñados.

- 5 Y el ADN genómico fue extraído con el DNeasy Plant Mini Kit del micelio usado para preparación ARN.
 Esterasa as1: 5' CCA CTC CAG GTT GTG GAA GCA ca 3' (SEC ID NO:5)
 Esterasa as2: 5' CAG CCG TTC TAT de mordaza TAC CAG Tc 3' (SEC ID NO:6)
 Esterasa as3: 5' CGA AGC GAC gato TCC AGT CCT CGA 3' (SEC ID NO:7)

10 Condición PCR

[0234]

1 ^{er} PCR	
10 x búfer PCR	5 µl
25 mM MgCl ₂	3 µl
10 mM dNTP mezcla	1 µl
10 µM esterasa como 1	1 µl
2,5 uM DW 1~4 (proporcionado por el kit)	4 µl
ADN genómico	1 µl
DNA-polimerasa dirigida por DNA	0,5 µl
Añadir agua autoclavada destilada a	50 µl

15

[0235] Condiciones: 94°C durante 3 min; 30 ciclos de 94°C durante 45 segundos, 55°C durante 45 segundos y 72°C durante 1 min; extensión final a 72°C durante 10 min.

2° PCR	
10 x búfer PCR	5 µl
25 mM MgCl ₂	3 µl
10 mM dNTP mezcla	1 µl
10 µM esterasa como 3	1 µl
10 µM cebador universal (proporcionado por el kit)	1 µl
20x diluido primera solución PCR	1 µl
DNA-polimerasa dirigida por DNA	0,5 µl
Añadir agua autoclavada destilada a	50 µl

20

[0236] Condiciones: 94°C durante 3 min; 30 ciclos de 94°C durante 45 segundos, 55°C durante 45 segundos y 72°C durante 1 min; extensión final a 72 °C durante 10 min.

[0237] Un fragmento 300 bp se obtuvo y se confirmó que era el 5' extremo del gen con el codón de inicio ATG.

25

[0238] Cebadores para clonación de longitud total fueron diseñados como:

Esterasa s01: 5' CAA ATG TCG CCG TTA GTA AAA GTC 3' (SEC ID NO:8)
 Esterasa as00: 5' TCT AGG CTT GCC gato TCG CTC CTA 3' (SEC ID NO:9)

110x búfer de polimerasa de DNA Pfu	5 µl
15 mM MgSO ₄	4 µl
10 mM dNTP	1 µl
10 µM s01	1 µl
10 µM as00	1 µl
ADN genómico	2 µl
Polimerasa de DNA Pfu	1 µl

30

[0239] Condiciones: 94°C durante 3 min; 30 ciclos de 94°C durante 45 segundos, 50°C durante 40 segundos y 72°C durante 2 min; extensión final a 72°C durante 10 min.

[0240] Un fragmento alrededor de 2kb se obtuvo y se confirmó que era el gen objetivo.

35 Ha contenido dos intrones bien predichos por Agene o por alineación con la región de codificación para péptido maduro.

ES 2 558 698 T3

Los intrones fueron quitados usando extension de superposición PCR.

Cebadores para eliminación de intrón fueron diseñados como:

Esterasa jumpas1: 5' TCC TGT CGA ACA GCC GTT CCA GTA CGA GTA TTC TTG 3' (SEC ID NO:10)

Esterasa jumps1: 5' TAC TCG TAC TGG AAC GGC TGT TCG ACA GGA GGA CGT CA 3' (SEC ID NO:11)

5 Esterasa jumpas2: 5' GGA TGG GTA ATA GTC CAA TGA TCT CAT GGT CAG AAT G 3' (SEQ ID NO:12)

Esterasa jumpas1: 5' ACC ATG AGA ATC TTG GAC TAC TAT CCA TCC AAC TGC GA 3' (SEC ID NO:13)

[0241] Tres reacciones PCR individuales fueron realizadas separadamente usando esterasa s01 con jumpas2, jumps1 con jumpas1 y jumps2 con as00.

10 Tres fragmentos de tamaño a 500 bp (fragmento I), 150 bp (fragmento II) y 1100 bp (fragmento III) fueron resultados por consiguiente.

Fragmentos de la PCR fueron purificados por PCR Preps sistema de purificación de ADN (Promega, n° de catálogo. A7170).

15 [0242] Extensión de superposición PCR fue realizada como se explica aquí:

1 ^{er} PCR sin cebadores	
10x búfer de polimerasa de DNA Pfu	5 µl
25 mM MgSO ₄	4 µl
10 mM dNTP	1 µl
Fragmento I + II + III 1+1+1	1 µl
Polimerasa de DNA Pfu	1 µl
H ₂ O	2 µl

20 [0243] Condiciones: 94°C durante 3 min; 4 ciclos de 94°C durante 40 segundos, 37°C durante 1 min y 72°C durante 2 min; dejado en el hielo hasta que el 2° PCR fue realizada con la adición de 1 µl de 10 µM esterasa s01 y as00 cada a la solución PCR y el programa fue 94°C durante 2 min; 25 ciclos de 94°C durante 40 segundos, 50°C durante 40 segundos y 72°C durante 2 min; extensión final a 72°C durante 10 min.

[0244] Un fragmento a -1,5 kb se obtuvo.

25 La secuencia de longitud total fue como explicado abajo (SEC ID n° 1).

La secuencia de aminoácidos deducida fue SEC ID n°: 2.

Posición 1-20 de la SEC ID No: 2 fue identificada como la señal por péptido señal, 21- 39 fue la secuencia N-terminal de la enzima (SEC ID n° 1) y 21-520 fue el péptido maduro.

30 El fragmento de longitud total fue clonado en el vector pGEM-T y transformado en la ElectroMax™ DH10B célula competente por electro-poración.

El clon positivo fue secuenciación confirmada y depositada en el DSMZ como DSM19428 (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1 b, D-38124 Braunschweig, Alemania).

Ejemplo 6: expresión de Esterasa de myrothecium de SEC ID n°: 2 en AspergillusCepas y plásmidos

35 [0245] E.coli DH12S (Gibco BRL) y E. coli DB6507 (disponible de ATCC con el número ATCC35673) (F⁻, pyrF74::Tn5; supE44, lacY1; ara14, galK2, xyl5, leuB6, proA2; hsdS20; recA13; rpsL20, thi1, lambda-) fueron usados para la construcción plásmida.

E.coli DB6507 fue especialmente usado para la amplificación de pJaL721 y sus entregas.

40 El plásmido pJaL721 es descrito en WO10170204.

Aspergillus oryzae BECh2 (descrito en WO00/39322) fue usado para la expresión de gen de enzima.

Medios

45 [0246] LB fue usado para el cultivo de E.coli.

Glucosa SC fue usada para el cultivo de S.cerevieiae.

LB	Bacto triptona	1%
	NaCl	1%
	Bacto-levadura ext	0.5%
	PH7.0	
Glucosa SC	20% glucosa*	100 ml/L

ES 2 558 698 T3

	5% treonina*	4 ml/L
	1% triptófano*	10 ml/L
	20% ácidos* de casamino	25 ml/L
	10 X solución* basal	100 ml/L
	* filtro esterilizado separadamente	
	Agar	20 g/L
	(PH final alrededor de 5,6)	
10X Basal	solución	
	Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos	66,8 g/L
	Succinato	100 g/L
	NaOH	60 g/L

Medio para transformación de Aspergillus

COVE	342,3 g/L sacarosa 20 ml/L solución salina COVE 10 mM acetamida 30 g/L agar noble	
COVE II	30 g/L sacarosa 20 ml/L solución salina COVE 10 mM, acetamida 30 g/L agar noble	
COVE-N-gly	218 g/L sorbitol 10 g /L glucosa 2,02 g/L KNO ₃ 50 ml/L solución salina COVE 25 g/L agar noble 10 g/L glicerol	pH5,2
Solución salina COVE	26 g KCl 26 g MgSO ₄ .7aq 76 g KH ₂ PO ₄ ,	
50 ml trazas metales COVE /L	0.04 g NaB ₄ O ₇ .10aq 0,4 g CuSO ₄ .5aq 1,2 g FeSO ₄ .7aq 0,7 g MnSO ₄ .aq	

ES 2 558 698 T3

		0,7 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{aq}$	
		0,7 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{aq} / \text{L}$	
5			
	Agarosa COVE	superior	
10		342,3 g/L sacarosa	
		20 ml/L solución salina COVE	
		10 mM acetamida	
15		10 g/L agarosa de bajo punto de fusión	
	SF medio (100ml/SF) para Aspergillus:		
20			
	MS-9	30 g /Lsoybean polvo	
	20	g/Lglycerol	pH 6,0
25	MDU-2Bp FuPE	45 g/L malto-dextrina	
		7 g/L extracto de levadura	
30			
	12 g/L KH_2PO_4		
35			
	0,75 g/L NH_4Cl		
	1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		
40	2 g/L K_2SO_4		
	1 g/L NaCl		
45	0,5 ml/L solución de metal traza de AMG	pH 6,0	
50			
55			

ES 2 558 698 T3

[0247] Solución de metal AMG: Citiric ácido 1aq 12 g/l, ZnSO₄ 7aq 57 g/l, CuSO₄ 5aq 10 g/l, NiCl₂ 6aq 2g/l, FeSO₄ 7aq 55 g/l, MnSO₄ 5aq 46,6 g/l.

5 [0248] Medio YPG: 4 g/L extracto de levadura, 1 g/L KH₂PO₄, 0,5 g/L MgSO₄ .7aq, 15 g/L glucosa, pH 6,0

[0249] STC búfer: 0,8 M sorbitol, 50 mM Tris pH 8,50 mM CaCl₂

[0250] Búfer STPC: 40 % PEG4000 en el STC búfer

10

Construcción de plásmidos de expresión para *Aspergillus* y su expresión en el *Aspergillus oryzae*

[0251] Para expresar el Gen de esterasa de *myrothecium* en el *Aspergillus*, el plásmido de expresión fue construido. El clon de cDNA de gen de esterasa fue amplificado por PCR que utiliza el plásmido en la cepa depositada DSM19428 como modelo y el cebador Ori F (SEC ID NO:14) y cebador Ori R (SEC ID NO:15) para introducir los sitios de enzima de restricción, BamHI y XhoI.

15

CebadorOri.F; 5'-CAACTGGGGATCCACCATGCAATCGCCGTTAG-3'

BamHI

CebadorOri.R; 5'-CAAACCGGCTCGAGCTCATGACACTCGAAAGAAGAAG-3'

20

XhoI

Condición PCR

	Temp. (°C)	Tiempo (min)	High Fidelity PCR Master Kit (Roche)		
1	94	2:00	Volumen total	50	µl
2	94	0:40	Modelo	0,3	µl
3	55	0:40	Cebador 100pmol/µl F	0,5	µl
4	72	1:30	Cebador 100pmol/µl R	0,5	µl
	Ir a 2	29 veces	Mezcla de polimerasa	25	µl
5	72	7:00	H ₂ O (calidad PCR)	23,7	µl

25 [0252] El fragmento amplificado 1,6 kb fue digerido con BamHI y XhoI, y ligado en el plásmido de expresión pJal721 (WO10170204) digerido con las mismas enzimas de restricción. El plásmido resultante fue designado como esterasa pJal721-ogrinal.

[0253] El plásmido fue transformado en *A. oryzae* BECh2 y transformantes fueron aislados como se describe en WO02/20730.

30

[0254] Cepa de *Aspergillus oryzae* BECh2 fue inoculada en 100 ml de medio YPG e incubado a 32°C durante 16 horas con agitación a 80 r.p.m.

Micelios cultivados fueron recogidos por filtración seguida de lavado con 0,6 M KCl y resuspendido en 30 ml de 0,6 M KCl que contienen Glucanex® (Novozymes) en la concentración de 30 µl/ml.

35

La mezcla fue incubada a 32°C con la agitación a 60 r.p.m. hasta protoplastos fueron formadas.

ES 2 558 698 T3

Tras la filtración para eliminar el micelios restante, protoplastos fueron recogidos por centrifugado y lavado con STC búfer dos veces.

Los protoplastos fueron contados con un hematímetro y resuspendidos en una solución de STC:STPC:DMSO (8:2:0.1) a una concentración final de $1,2 \times 10^7$ protoplastos/ml.

5 Aproximadamente 4 µg de ADN se añadió a 100 µl de solución de protoplasto, mezclado suavemente e incubado en el hielo durante 30 minutos. 1 µl búfer STPC se añadió a la mezcla e incubado a 37°C para otro 30 minutos.

Después de la adición de 10 ml de agarosa superior COVE pre- calentada a 50°C, la mezcla reactiva fue vertida sobre placas de agar de COVE.

Las placas fueron incubadas a 32°C durante 5 días.

10 [0255] Transformantes aparecidos fueron aislados en el COVE-II y usados para el cultivo en el matraz de agitación.

[0256] Las cepas fueron cultivadas en medio MS-9 durante 1 día como el cultivo de semilla, luego transferido en MDU-2Bp FuPE medio para producción enzimática.

15 El caldo de cultivo fue usado para el ensayo enzimático (pNPB ensayo).

Como los resultados, algunos de transformantes obtenidos mostraron actividades significativamente más altas que el otros.

Fue confirmado en SDS-PAGE (12,5 % poli de SDS electroforesis en gel de acrilamida a 20 mamá durante 0.5 hr, y manchado con SiPRO naranja) que estos transformantes segregaban alta cantidad de esterasa, mientras la proteína equivalente no era segregada de la cepa huésped usada BECh2.

20

Ejemplo 7: prueba de digestión in vitro de esterasa

[0257] Esterasa (SEC ID NO:2) fue expresada y excretada de *Aspergillus oryzae* según el Ejemplo 6.

25 El rendimiento de la esterasa purificada fue evaluado en este ejemplo.

El propósito del actual estudio fue indagar la eficacia de xilanasas en combinación con una esterasa en cuanto solubilización de polisacáridos no de almidón (NSP).

La esterasa mencionada en el ejemplo se refiere a la esterasa de SEC ID NO:2.

30 Xilanasas

[0258] Las siguientes enzimas fueron evaluadas:

35 La RONOZYME WX xilanasas, una xilanasas de pienso para animales de monocomponente conocido derivada de *Thermomyces lanuginosus* y disponible comercialmente de DSM productos nutricionales, Wurmisweg 576; CH-4303 Kaiseraugst, Suiza (esta xilanasas es también descrita en WO 96/23062);

La xilanasas Shearzima 500, una xilanasas monocomponente derivada de *Aspergillus aculeatus* y disponible comercialmente de Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca.

40

[0259] El estudio fue focalizado en la cuantificación del arabinoxilano total (suma de arabinosa y xilosa) contenido después incubación in vitro en un procedimiento que imita los pasos de digestión pequeña intestinal y gástrica en la digestión monogastrica.

En el sistema in vitro hasta 15 tubos de ensayo, con un sustrato de interés, fueron incubados con HCl/pepsina (digestión gástrica de simulando), y posteriormente con pancreatina (simulando digestión intestinal).

45

Tres tubos de ensayo fueron usados para cada tratamiento incluido.

Al final de la fase de incubación intestinal, muestras de la digesta in vitro fueron quitadas y analizadas en busca de polisacáridos de fibra insoluble.

50 [0260] Un perfil del procedimiento in vitro se muestra en Tabla 2 donde pH y temperatura indican los puntos establecidos respectivos (valores objetivo).

Tabla 2: perfil de procedimiento de digestión in vitro

Componentes adicionados	pH	Temperatura	Paso del tiempo	Fase de digestión simulada
0,8 g sustrato, 4,1 ml HCl-1 (0,072 M)	3,0	40°C	t=0 min	Mezcla
0,5 ml HCl-2 (0,072 M) / pepsina (3000 U/g sustrato), 0,1 ml solución enzimática	3,0	40°C	t=30 min	Digestión gástrica
0,9 ml NaOH (0,16 M)	6,8	40°C	t=1,5 horas	Digestión intestinal

ES 2 558 698 T3

0,4 ml NaHCO ₃ (1M) / pancreatina (8 mg/g dieta)	6,8	40°C	t=2,0 horas	Digestión intestinal
Terminar incubación	6,8	40°C	t=6,0 horas	

Condiciones

[0261]

5

Sustrato: 0,7 g maíz (molido a pasar un 0,5 mm pantalla), 0,3 g harina de soja, proporcionado como una dieta pre-mezclada

PH: paso de estómago = pH 3,0 / paso intestinal = pH 6,8 (hacia la terminación de la incubación del pH puede estar a la altura de 7,0)

10 HCl: 0,072 M durante 1,5 horas (es decir 30 min premezcla de sustrato de HCl)

Pepsina: 3000 U /g dieta durante 1 hora (Sigma P-7000)

Pancreatina: 8 mg/g dieta durante 4 horas (Sigma P-7545)

Temperatura: 40°C.

15 Réplicas: 3

Soluciones usadas para la incubación in vitro

[0262] HCl-1: 0,072 M HCl que contiene Ca²⁺

20 Hacer 500 mL: 3676 mg CaCl₂ · 2H₂O y 36 mL 1 M HCl, relleno con agua desionizado (CaCl₂ · 2H₂O = 5 mM * 0,5 L * 147,02 g/mol = 367,55 mg CaCl₂ · 2H₂O)

[0263] HCl-2: HCl/pepsina:

Hacer mismo día

25 Hacer 100 mL: pesar y distribuir 1,06 g pepsina, relleno con HCl-1.

[0264] 0,16 M NaOH:

Hacer 100 mL: 16 mL 1 M NaOH, relleno con agua desionizado.

30 [0265] Pancreatina disuelta en 1 M NaHCO₃ que contiene 8 mg dieta de pancreatina/g: NaHCO₃ -pancreatin es pre hecho, dividido en partes y congelado.

Es lentamente descongelado en el frigorífico durante la noche antes de su uso.

35 [0266] Búfer de acetato sódico para adiciones enzimáticas y lavado en los procedimientos de análisis fibroso: búfer acetato, 0,1 M, pH 5.

[0267] Solución A: 0,2 M ácido acético:

2,85 ml ácido acético y 250 mL con agua milliQ.

40 [0268] Solución B: 0,2 M acetato sódico:

13,6 g trihidrato de acetato sódico y 500 mL con agua milliQ.

[0269] 100 mM búfer:

148 mL solución A

45 352 mL solución B

735 mg CaCl₂ · 2H₂O

Aprox. 400 ml agua milliQ

Control que pH es 5,0, si no ajusta.

Relleno a 1000 mL con agua desionizada.

50

Determinaciones de proteína enzimática

[0270] La cantidad de concentración de proteína enzimática (EP) para la esterasa purificada fue calculada basándose en los valores A₂₈₀ y las secuencias de aminoácidos (composiciones de aminoácido) utilizando los principios perfilados en S.C.Gill & P.H. von Hippel, Analytical Biochemistry 182, 319-326, (1989).

55

Procedimiento experimental para modelo in vitro

[0271] El procedimiento experimental fue según el anterior perfil. pH fue medido a tiempo 1, 2,5, y 5,5 horas.

ES 2 558 698 T3

Incubaciones fueron terminadas tras 6 horas y muestras fueron quitadas y colocadas en el hielo antes del centrifugado (10000 x g, 10 min, 4°C).

Sobrenadantes fueron descartados y el residuo de granulado lavado una vez con un búfer de acetato sódico (pH 5 y 100 mM).

5

Análisis

[0272] El análisis de polisacáridos de fibra restante fue hecho según heander et al (1995): Total dietary fiber determined as neutral sugar residues, uronic acid residues, y Klason lignin (el método Uppsala): Collaborative study, in J.

10 AOAC Int. vol. 78, nº 4, págs. 1030-1044, excepto que la celulosa no fue analizada en el presente ejemplo.

En resumen, el almidón en la muestra se quita mediante un procedimiento de digestión enzimática con alfa-amilasa y amiloglucosidasa.

Polímeros solubles se precipitan a concentración de etanol acuoso 80%.

15 [0273] Polisacáridos precipitados e insolubles se hidrolizan durante 55 minutos a 125°C en 0,4 M ácido sulfúrico junto con un estándar interno (mioinositol) azúcares neutrales liberados se cuantifican por cromatografía gas-líquido como acetatos de alditol y su contenido calculado relativamente al estándar interno y tomando el peso de muestra original en la cuenta.

20 Actividad xilanolítica

[0274] La actividad xilanolítica se puede expresar en unidades FXU, determinadas a pH 6,0 con remazol-xilano (4-O-metil-D-glucurono-D-xilano teñido con Remazol azul brillante R, Fluka) como Sustrato.

25 [0275] Una muestra de xilanasa se incuba con el sustrato de remazol-xilano.

El fondo de sustrato teñido no-degradado se precipita por etanol.

El color azul restante en el sobrenadante (como determinado espectrofotométricamente a 585 nm) es proporcional a la actividad de xilanasa, y las unidades de xilanasa son luego determinadas relativas a un estándar enzimático a condiciones de reacción estándar Vs, es decir a 50,0°C, pH 6,0, y 30 minutos tiempo de reacción.

30 La Tabla 3 más abajo muestra el contenido de peso fresco (%) de residuos de arabinoxilano insoluble (suma de arabinosa y xilosa) en la pienso después de la incubación in vitro con los diferentes tratamientos de xilanasa y esterasa. El control es sin enzimas adicionadas.

Tabla 3

Tratamiento	Contenido de arabinoxilano (%) (\pm desviación típica)
Control, ningún tratamiento enzimático, 0,1 ml adicionado de protección	3,97 ^a (\pm 0,125)
RONOZYME WX + shearzima (10000 + 10000 FXU/kg dieta) vía 0,1 ml búfer	3,85 ^a (\pm 0,015)
RONOZYME WX + shearzima (10000 + 10000 FXU/kg dieta) vía 0,1 ml de protección + Esterasa de myrothecium a 5 mg EP/kg dieta, vía 0,1 ml búfer	3,63 ^b (\pm 0,095)
RONOZYME WX + shearzima (1000 + 1000 FXU/kg dieta) vía 0,1 ml de protección + Esterasa de myrothecium a 5 mg EP/kg dieta vía 0,1 ml búfer	3,56 ^b (\pm 0,207)
Esterasa de myrothecium a 5 mg EP/kg dieta vía 0,1 ml búfer	3,95 ^a (\pm 0,099)

Ab: medios dentro de una columna no compartiendo una letra superíndice común difieren con significación estadística (P<0,05).

35

[0276] Es aparente de la Tabla 3 que, sorprendentemente, la adición de la esterasa de Myrothecium produce una reducción estadísticamente significativa en la fracción de arabinoxilano insoluble, es decir una solubilización.

Al añadir la esterasa la dosis de xilanasa se puede reducir hasta 10 veces mientras todavía obteniendo una reducción estadísticamente significativa en el contenido de rabinoxilanos insoluble.

40

Depósito de Material biológico

[0277] Lo siguiente material biológico ha sido depositado según las condiciones del Budapest Treaty with the DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1 B, D-38124 Braunschweig, Alemania, y se les ha dado el siguiente número de accesión:

45

Depósito	Número de Acceso	Fecha de Depósito
Escherichia coli	DSM19428	14 de junio 2007

ES 2 558 698 T3

[0278] La cepa ha sido depositada bajo condiciones que aseguran que acceso al cultivo será disponible durante la pendencia de esta solicitud de patente a una determinada por las leyes de patentes extranjeras autorizadas a ello.

El depósito representa un cultivo sustancialmente puro de la cepa depositada.

5 El depósito es disponible según sea necesario por leyes de patente extranjera en países donde duplicados de la aplicación de sujeto o su descendiente son solicitados.

No obstante, se debe entender que la disponibilidad de un depósito no constituye una licencia a practicar la presente invención en dérogas de derecho resultante de las patentes concedida por acción gubernativa.

10 Listado de secuencias

[0279]

<110> Novozymes A/S

15

<120> polipéptidos con actividad de esterasa y ácidos nucleicos que codifican el mismo

<130> 10776.204-WO

20

<140> EP09151012.3

<141> 2009-01-21

<160> 15

25 <170> Versión de patentIn 3.3

<210> 1

<211> 1684

<212> ADN

30

<213> Myrothecium sp.

<220>

<221> sig_péptido

<222> (1)..(60)

35

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1560)

40

<400> 1

ES 2 558 698 T3

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

ES 2 558 698 T3

130		135		140		
atg gtg ggg aaa gac agc atc aat tgg tac aat atg ctg aat ttc ttc						480
Met Val Gly Lys Asp Ser Ile Asn Trp Tyr Asn Met Leu Asn Phe Phe						
145		150		155		160
tcc gtg gcc cta gac gat gca gct aca ttg ggc aag gca gcc gtt gtc						528
Ser Val Ala Leu Asp Asp Ala Ala Thr Leu Gly Lys Ala Ala Val Val						
		165		170		175
gcc tac tat gga cga gaa caa gaa tac tcg tac tgg aac ggc tgt tcg						576
Ala Tyr Tyr Gly Arg Glu Gln Glu Tyr Ser Tyr Trp Asn Gly Cys Ser						
		180		185		190
aca gga gga cgt caa ggc ttc atg atg gcc cag aga tac cca gaa cag						624
Thr Gly Gly Arg Gln Gly Phe Met Met Ala Gln Arg Tyr Pro Glu Gln						
		195		200		205
tac gat ggc att ctc gcc tct gcg ccc gcc att aac tgg ggc cag ctg						672
Tyr Asp Gly Ile Leu Ala Ser Ala Pro Ala Ile Asn Trp Gly Gln Leu						
		210		215		220
gtc atc agc atg tac ttg ccc att ctg acc atg aga tca ttg gac tat						720
Val Ile Ser Met Tyr Leu Pro Ile Leu Thr Met Arg Ser Leu Asp Tyr						
		225		230		235
tac cca tcc aac tgc gag ctc aat gct att aca agc gct gct gtt gaa						768
Tyr Pro Ser Asn Cys Glu Leu Asn Ala Ile Thr Ser Ala Ala Val Glu						
		245		250		255
gca tgt gat gaa gct gac ggt ctg aag gac gac gta gtt gtg cgg aca						816
Ala Cys Asp Glu Ala Asp Gly Leu Lys Asp Asp Val Val Val Arg Thr						
		260		265		270
tgg gag tgc gaa ttc gat gct tcg agc gtc gtc ggc cag aag tac agc						864
Trp Glu Cys Glu Phe Asp Ala Ser Ser Val Val Val Gly Gln Lys Tyr Ser						
		275		280		285
tgc gga aac gag tct ggt atc atc acc tcc cag gct gcc gag gtt gct						912
Cys Gly Asn Glu Ser Gly Ile Ile Thr Ser Gln Ala Ala Glu Val Ala						
		290		295		300
tcc aca acc tgg agt ggc tcc gtc ttc cag aac ggc cga cgt gct gga						960
Ser Thr Thr Trp Ser Gly Ser Val Phe Gln Asn Gly Arg Arg Ala Gly						
		305		310		315
tgg gga ctt gct cca tcg gct ccc ttg gtt ggc att gct aac gtt gtt						1008
Trp Gly Leu Ala Pro Ser Ala Pro Leu Val Gly Ile Ala Asn Val Val						
		325		330		335
tgc tcc tcg ccc ggt gat tgt gaa ccg gca ccc ttc atc ctc tca acc						1056
Cys Ser Ser Pro Gly Asp Cys Glu Pro Ala Pro Phe Ile Leu Ser Thr						
		340		345		350
caa tgg atc tcc aag ttc gtt ctt gag aac age gat gcg gac ctc tcc						1104
Gln Trp Ile Ser Lys Phe Val Leu Glu Asn Ser Asp Ala Asp Leu Ser						
		355		360		365
acc ctt acg gac gag gag tat ctc agc ctc ttc cgc caa tcg gcc aac						1152
Thr Leu Thr Asp Glu Glu Tyr Leu Ser Leu Phe Arg Gln Ser Ala Asn						
		370		375		380
aag tac agc tca ctc tcc gac acg aac gat ccg gat ctg acc gac ttc						1200
Lys Tyr Ser Ser Leu Ser Asp Thr Asn Asp Pro Asp Leu Thr Asp Phe						
		385		390		400

ES 2 558 698 T3

aag ttg gcc ggc ggc aag atg att aca tgg cac ggc ggc gac gat atc 1248
 Lys Leu Ala Gly Gly Lys Met Ile Thr Trp His Gly Gly Asp Asp Ile
 405 410 415

ctc att cca tac aac agt acc gtc gat tac tac gag aaa gtt gct gca 1296
 Leu Ile Pro Tyr Asn Ser Thr Val Asp Tyr Tyr Glu Lys Val Ala Ala
 420 425 430

ctg gac gca gac gtc ttg gac tac ttc aga ttc ttc tca gcg ccc gga 1344
 Leu Asp Ala Asp Val Leu Asp Tyr Phe Arg Phe Phe Ser Ala Pro Gly
 435 440 445

gtt cag cac tgc cag gac gga gct ggg tgg ttc ccc ggt gag gcg ttt 1392
 Val Gln His Cys Gln Asp Gly Ala Gly Trp Phe Pro Gly Glu Ala Phe
 450 455 460

gag tcc ctg gtc gac tgg gtt gag aat ggc aaa gct cca gag acg ctg 1440
 Glu Ser Leu Val Asp Trp Val Glu Asn Gly Lys Ala Pro Glu Thr Leu
 465 470 475 480

tat ggc agg cct cgt ggt agc aac ttc act gga gag aga gaa gcc aac 1488
 Tyr Gly Arg Pro Arg Gly Ser Asn Phe Thr Gly Glu Arg Glu Ala Asn
 485 490 495

ttg tgc ctg tat ccc aag cag atc cgt tac att ggg gga gac ccg gag 1536
 Leu Cys Leu Tyr Pro Lys Gln Ile Arg Tyr Ile Gly Gly Asp Pro Glu
 500 505 510

gtt gct tct tct ttc gag tgt cag tgagaaactg ccggttttgt caaggcagag 1590
 Val Ala Ser Ser Phe Glu Cys Gln
 515 520

aagaattggg caagttcatg tctccttatac tcattgacac gaaatagtag gcagtattgg 1650

ttgcgaacaa ataggagcga atgggcaagc ctag 1684

<210> 2
 <211> 520
 <212> PRT
 <213> Myrothecium sp.

5

<400> 2

Met Gln Ser Pro Leu Val Lys Val Leu Met Ala Ser Thr Ala Ala Gln
 1 5 10 15

Val Val Gln Ala Ser Ser Cys Ser Pro Glu Val Phe Ser Ser Val Gly
 20 25 30

Ile Pro Lys Gly Glu Val Leu Ser Leu Thr Ala Glu Leu Ala Glu Thr
 35 40 45

Leu Pro Ser Gln Gln Thr Ala Asn Asn Trp Pro Ile Phe Ser Asn Thr
 50 55 60

Thr Thr Leu Thr Cys Gln Val Thr Ile Gln Tyr Thr His Pro Gly Trp
 65 70 75 80

ES 2 558 698 T3

Asn Asp Thr Ile Asn Thr Tyr Val Trp Leu Pro Val Glu Asp Trp Asn
 85 90 95
 Gly Arg Phe Val Gly Val Gly Gly Gly Trp Ala Ala Gly Gln Pro
 100 105 110
 Thr Asp Leu Gly Leu Gln Val Ala Arg Gly Tyr Ala Ala Val Thr Thr
 115 120 125
 Asp Gly Gly His Pro Phe Glu Arg Ser Asp Asp Leu Asp Tyr Trp Ala
 130 135 140
 Met Val Gly Lys Asp Ser Ile Asn Trp Tyr Asn Met Leu Asn Phe Phe
 145 150 155 160
 Ser Val Ala Leu Asp Asp Ala Ala Thr Leu Gly Lys Ala Ala Val Val
 165 170 175
 Ala Tyr Tyr Gly Arg Glu Gln Glu Tyr Ser Tyr Trp Asn Gly Cys Ser
 180 185 190
 Thr Gly Gly Arg Gln Gly Phe Met Met Ala Gln Arg Tyr Pro Glu Gln
 195 200 205
 Tyr Asp Gly Ile Leu Ala Ser Ala Pro Ala Ile Asn Trp Gly Gln Leu
 210 215 220
 Val Ile Ser Met Tyr Leu Pro Ile Leu Thr Met Arg Ser Leu Asp Tyr
 225 230 235 240
 Tyr Pro Ser Asn Cys Glu Leu Asn Ala Ile Thr Ser Ala Ala Val Glu
 245 250 255
 Ala Cys Asp Glu Ala Asp Gly Leu Lys Asp Asp Val Val Val Arg Thr
 260 265 270
 Trp Glu Cys Glu Phe Asp Ala Ser Ser Val Val Gly Gln Lys Tyr Ser
 275 280 285
 Cys Gly Asn Glu Ser Gly Ile Ile Thr Ser Gln Ala Ala Glu Val Ala
 290 295 300
 Ser Thr Thr Trp Ser Gly Ser Val Phe Gln Asn Gly Arg Arg Ala Gly
 305 310 315 320
 Trp Gly Leu Ala Pro Ser Ala Pro Leu Val Gly Ile Ala Asn Val Val
 325 330 335
 Cys Ser Ser Pro Gly Asp Cys Glu Pro Ala Pro Phe Ile Leu Ser Thr

ES 2 558 698 T3

	340		345		350
Gln Trp	Ile Ser Lys Phe Val Leu Glu Asn Ser Asp Ala Asp Leu Ser				
	355		360		365
Thr Leu Thr	Asp Glu Glu Tyr Leu Ser Leu Phe Arg Gln Ser Ala Asn				
	370		375		380
Lys Tyr Ser Ser	Leu Ser Asp Thr Asn Asp Pro Asp Leu Thr Asp Phe				
	385		390		400
Lys Leu Ala Gly	Gly Lys Met Ile Thr Trp His Gly Gly Asp Asp Ile				
			405		410
Leu Ile Pro Tyr	Asn Ser Thr Val Asp Tyr Tyr Glu Lys Val Ala Ala				
			420		425
Leu Asp Ala Asp	Val Leu Asp Tyr Phe Arg Phe Phe Ser Ala Pro Gly				
			435		440
Val Gln His Cys	Gln Asp Gly Ala Gly Trp Phe Pro Gly Glu Ala Phe				
			450		455
Glu Ser Leu Val	Asp Trp Val Glu Asn Gly Lys Ala Pro Glu Thr Leu				
			465		470
Tyr Gly Arg Pro	Arg Gly Ser Asn Phe Thr Gly Glu Arg Glu Ala Asn				
			485		490
Leu Cys Leu Tyr	Pro Lys Gln Ile Arg Tyr Ile Gly Gly Asp Pro Glu				
			500		505

Val Ala Ser Ser Phe Glu Cys Gln
515 520

<210> 3
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Myrothecium sp.

<400> 3
 Ser Ser Cys Ser Pro Glu Val Phe Ser Ser Val Gly Ile Pro Lys Gly
 1 5 10 15

Glu Val Leu

<210> 4

ES 2 558 698 T3

<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Cebador

<220>
<221> misc_feature
10 <222> (9) .. (9)
<223> r i s t o c

<220>
<221> misc feature
15 <222> (12)..(12)
<223> n i s a , t , c o g

<220>
<221> misc feature
20 <222> (15)..(15)
<223> d i s a o g

<220>
<221> misc feature
25 <222> (18)..(18)
<223> n i s a , t , c o g

<400> 4
30 Gtcgcatnc cnaanggnga 20

<210> 5
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> Cebador

<400> 5
40 Ccactccagg ttgtgaagc aac 23

<210> 6
<211> 23
<212> ADN
45 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

50 <400> 6
Cagccgttcc agtacgagta ttc 23

<210> 7
55 <211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
60 <223> Cebador

<400> 7

ES 2 558 698 T3

Cgaagcgacc attccagtcc tcga 24

5 <210> 8
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Cebador

<400> 8
Atgcaatcgc cgtagtaaa agtc 24

15 <210> 9
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Cebador

<400> 9
Tctaggcttg cccattcgct ccta 24

25 <210> 10
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Cebador

<400> 10
Tcctgtcgaa cagccgttcc agtacgagta ttcttg 36

35 <210> 11
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> Cebador

<400> 11
Tactcgtact ggaacggctg ggacgtca de ttcgacagga 38

45 <210> 12
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> Cebador

55 <400> 12
Ggatgggtaa tagtccaatg atctcatggt cagaatg 37

60 <210> 13
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

ES 2 558 698 T3

<220>

<223> Cebador

<400> 13

5 Accatgagat cattggacta ttaccatcc aactgcga 38

<210> 14

<211> 32

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

15 <400> 14

Caactgggga tccacatgc aatcgccgtt ag 32

<210> 15

<211> 38

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

25

<400> 15

Caaaaccggc tcgagctcat gacactcgaa agaagaag 38

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido aislado con actividad de esterasa, seleccionado del grupo consistente en:
- 5 (a) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos con al menos una identidad del 75% al polipéptido maduro de SEC ID nº: 2;
- (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que hibridiza con (i) la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID nº: 1 bajo condiciones de astringencia al menos altas, (ii) la secuencia de ADNc contenida en la secuencia que codifica el polipéptido maduro de SEC ID nº: 1, o (iii) una cadena complementaria de longitud completa de (i) o (ii);
- 10 (c) un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos una identidad del 75% a la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID nº: 1; y
- (d) una variante de (a); (b) o (c) que comprende una sustitución, delección, y/o inserción del polipéptido maduro de SEC ID NO:2 donde el número total de sustituciones de aminoácidos, delecciones y/o inserciones del polipéptido maduro de SEC ID nº: 2 está entre 1 y 10;
- 15 y donde el polipéptido tiene al menos el 90% de la actividad de esterasa del polipéptido maduro de SEC ID nº: 2.
2. Polipéptido aislado según la reivindicación 1, que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 2.
- 20 3. Polipéptido aislado según la reivindicación 1, que comprende o consiste en el polipéptido maduro de SEC ID nº: 2.
4. Polinucleótido aislado, que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido según la reivindicación 1.
- 25 5. Polinucleótido aislado según la reivindicación 4, que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido maduro de SEC ID nº: 2.
6. Polinucleótido aislado según la reivindicación 4, que comprende o consiste en la secuencia que codifica el polipéptido maduro de SEC ID nº: 1.
- 30 7. Constructo de ácidos nucleicos que comprende el polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 operativamente enlazado a una o varias secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un huésped de expresión adecuado.
- 35 8. Vector de expresión recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos según la reivindicación 7.
9. Célula huésped recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos según la reivindicación 7 o el vector según la reivindicación 8.
- 40 10. Planta transgénica, o parte de planta, capaz de expresar el polipéptido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
11. Animal transgénico no-humano, o productos o elementos del mismo, capaz de expresar polipéptido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 45 12. Método para producir un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el método comprende (a) cultivar una célula huésped recombinante según la reivindicación 9 para producir un sobrenadante que comprende el polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.
13. Uso del polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el pienso para animales.
- 50 14. Uso del polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en la preparación de una composición para el uso en pienso para animales.
15. Composición que comprende al menos un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 55 16. Composición según la reivindicación 15 que comprende además:
- (a) al menos una vitamina liposoluble, y/o
- (b) al menos una vitamina hidrosoluble, y/o
- (c) al menos un oligoelemento.
- 60 17. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 16, que comprende además amilasa, fitasa, xilanasas, galactanasas, alfa-galactosidasas, proteasa, fosfolipasas, beta-glucanasas y/o arabinofuranosidasas.

ES 2 558 698 T3

18. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17 que es un aditivo de pienso.
19. Composición de pienso animal que comprende polipéptidos de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o composición de cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18.
20. Método para mejorar el valor nutricional de un pienso para animales, donde el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o la composición de cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19 se añade al pienso.