

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 608 690**

51 Int. Cl.:

C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.05.2010 PCT/US2010/035667**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.11.2010 WO10135588**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2010 E 10778424 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2432797**

54 Título: **Fitasas, ácidos nucleicos que las codifican y métodos para su producción y uso**

30 Prioridad:

21.05.2009 US 180283 P

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

12.04.2017

73 Titular/es:

**BASF ENZYMES LLC (100.0%)
3550 John Hopkins Court
San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**WEINER, DAVID P.;
SOLBAK, ARNE I. JR. y
MCCANN, RYAN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 608 690 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

Fitasas, ácidos nucleicos que las codifican y métodos para su producción y uso

5 Esta solicitud se está presentando electrónicamente a través del servidor de EFS-WEB USPTO, según se autoriza y expone en MPEP §1730 II.B.2(a)(A), y esta presentación electrónica incluye un listado de secuencias (SEQ ID) presentado electrónicamente. Todo el contenido de este listado de secuencias se incorpora a la presente por referencia a todos los efectos. El listado de secuencias se identifica en el archivo .txt presentado electrónicamente como se indica continuación:

10

Nombre del archivo	Fecha de creación	Tamaño (bytes)
D1370_17WO_sequence_listing.txt	20 de mayo de 2010	58 575 bytes

Campo de la invención

15

La presente invención se refiere a fitasas, a polinucleótidos que las codifican, a usos de los polinucleótidos y polipéptidos de la invención, así como a la producción y aislamiento de dichos polinucleótidos y polipéptidos. En particular, la invención proporciona polipéptidos que, en condiciones de alta temperatura, tienen actividad fitasa, y fitasas que conservan su actividad después de exposición a altas temperaturas. La invención proporciona además fitasas que tienen una mayor labilidad gástrica. Las fitasas de la invención pueden usarse en productos alimenticios para mejorar el valor nutritivo de los ingredientes ricos en fitasas. Las fitasas de la invención pueden formularse como alimentos, como piensos o como complementos, por ejemplo, para ayudar a realizar la digestión del fitato. Los alimentos o piensos de la invención pueden estar en forma de gránulos, líquidos, polvos y similares. En un aspecto, las fitasas de la invención son estables frente a la desnaturalización térmica durante la granulación, y esto disminuye el coste del producto fitasa manteniendo al mismo tiempo la eficacia in vivo y la detección de la actividad en la alimentación.

25

Antecedentes

30

Los minerales son alimentos esenciales para el crecimiento de todos los organismos. Los minerales dietéticos pueden proceder de muchas fuentes materiales, incluidas las plantas. Por ejemplo, las semillas de las plantas son una fuente rica de minerales ya que contienen iones formando complejos con los grupos fosfatos de moléculas de ácido fítico. Estos minerales asociados a fitato pueden, en algunos casos, satisfacer las necesidades dietéticas de algunas especies de animales de granja, tales como rumiantes multigástricos. Por consiguiente, en algunos casos, los rumiantes requieren menos complementación dietética con fosfato inorgánico y minerales debido a que los microorganismos que se encuentran en el rumen producen enzimas que catalizan la conversión del fitato (hexafosfato de mioinositol) a inositol y fosfato inorgánico. En el proceso, se liberan los minerales que han formado complejo con el fitato. Sin embargo, la mayoría de las especies de animales de granja, no pueden utilizar eficazmente los minerales asociados a fitato. Por tanto, por ejemplo, en la producción pecuaria de animales monogástricos (por ejemplo, cerdos, aves y peces), para mejorar las tasas de crecimiento, el pienso se complementa normalmente con minerales y/o con antibióticos que modifican el medio de la flora digestiva del organismo consumidor.

40

Como tal, existen muchas cargas problemáticas - relacionadas con nutrición, etapas de tratamiento *ex vivo*, salud y medicina, conservación ambiental y gestión de recursos- que están asociadas con una hidrólisis insuficiente de fitato en muchas aplicaciones. A continuación se indican ejemplos no limitantes de estos problemas:

45

- 1) La complementación de dietas con minerales inorgánicos tiene un coste elevado.
- 2) La presencia de fitato no hidrolizado es indeseable y problemática en muchas aplicaciones *ex vivo* (por ejemplo, ocasionando la presencia de sedimento residual no deseado).
- 3) La complementación de dietas con antibióticos plantea una amenaza médica en seres humanos y en animales por igual, aumentando la abundancia de patógenos tolerantes a antibióticos
- 4) La liberación de minerales fecales no absorbidos en el medio ambiente altera y daña los ecosistemas de suelos circundantes, aguas de piscifactorías y aguas de superficie en general.
- 5) Las valiosas ofertas nutricionales de muchos productos alimenticios posibles permanecen sin explotar y desaprovechadas, de un modo significativo.

55

Por consiguiente, los productos alimenticios que contienen fitato requieren complementación con nutrientes exógenos y/o con una fuente de actividad fitasa para corregir sus deficientes ofertas nutricionales tras el consumo por una gran cantidad de especies de organismos.

60

Por consiguiente, en diversas aplicaciones existe una necesidad de medios que consigan una hidrólisis eficaz y rentable del fitato. Particularmente, existe una necesidad de medios que optimicen la hidrólisis del fitato en aplicaciones comerciales. En un aspecto particular, existe una necesidad de optimizar métodos de tratamiento

convencionales que mejoren las ofertas nutricionales de los productos alimenticios que contienen fitato para el consumo en seres humanos y en animales de granja.

El documento WO 2008/017066 describe un polipéptido que tiene una actividad fitasa y que tiene al menos 95% de identidad de secuencia con la fitasa appA de *E. coli*, teniendo el polipéptido al menos una mutación. El documento WO 2007/112739 describe que la posición 247 en la bacteria *Citrobacter Braakii* está involucrada en la sensibilidad a proteasas.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona polipéptidos que tienen actividad fitasa, polinucleótidos que los codifican, usos de los polipéptidos y polinucleótidos de la invención y métodos para la producción y aislamiento de dichos polipéptidos y polinucleótidos. En un aspecto, la invención proporciona polipéptidos que tienen actividad fitasa en condiciones de alta temperatura, y fitasas que conservan su actividad después de exposición a altas temperaturas. Las fitasas de la invención pueden usarse en productos alimenticios para mejorar el valor nutritivo de los ingredientes ricos en fitato. Las fitasas de la invención pueden formularse como alimentos o piensos o complementos para, por ejemplo, ayudar a realizar la digestión del fitato. Los alimentos o piensos de la invención pueden estar en forma de gránulos, comprimidos, píldoras, líquidos, polvos, aerosoles y similares. En un aspecto, las fitasas de la invención son estables frente a desnaturalización térmica durante la granulación; y esto disminuye el coste del producto fitasa manteniendo al mismo tiempo la eficacia *in vivo* y la detección de la actividad en la alimentación.

SUMARIO:

La invención proporciona ácidos nucleicos aislados, sintéticos o recombinantes que comprenden:

(a) (i) una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una actividad fitasa y que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% o más de identidad de secuencia con SEC ID No: 1, donde el polipéptido comprende la mutación Q247H. El polipéptido puede comprender al menos una mutación adicional seleccionada entre las que se enumeran en la Tabla 4, 5, 6, 7, 9 o cualquier combinación de las mismas;

(ii) una secuencia de polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una actividad fitasa y que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% o más de identidad de secuencia con SEC ID No: 2, donde el polipéptido comprende la mutación Q247H. El polipéptido puede comprender al menos una mutación adicional seleccionada entre las mutaciones que se enumeran en la Tabla 4, 5, 6, 7, 9 o cualquier combinación de las mismas.

El polipéptido codificado de este modo tiene una termotolerancia superior o igual a la de la secuencia parental y una labilidad gástrica mayor que la de la secuencia parental.

Las identidades de secuencia pueden determinarse por análisis con un algoritmo de comparación de secuencias o por una inspección visual, y opcionalmente el algoritmo de comparación de secuencias es un algoritmo BLAST versión 2.2.2 donde se establece un entorno de filtración con respecto a blastall -p blastp -d "nr pataa" -F F, y otras opciones se establecen por defecto;

Dicha al menos una mutación adicional se puede seleccionar entre: A109V, A232P, A236H, A236T, A248L, A248T, A274F, A274I, A274L, A274T, A274V, A429P, C155Y, D139Y, E113P, F147Y, F194L, G171M, G171S, G257A, G257R, G353C, G395E, G395I, G395L, G395Q, G395T, G67A, H263P, H272W, I107H, I107P, I108A, I108Q, I108R, I108S, I108Y, I174F, I174P, I427G, I427S, I427T, K151H, K151P, L126R, L146R, L146T, L150T, L150Y, L157C, L157P, L167S, L192F, L216T, L235I, L244S, L269I, L269T, L296T, L379S, L379V, L50W, M51A, M51G, M51L, N148K, N148M, N148R, N161K, N266P, N339E, N348K, N348W, P100A, P145L, P149L, P149N, P217D, P217G, P217L, P217S, P254S, P269L, P343E, P343I, P343L, P343N, P343R, P343V, Q137F, Q137L, Q137V, Q137Y, Q246W, Q275H, Q309P, Q377R, Q381S, Q86H, S102A, S102Y, S173G, S173H, S173V, S197G, S208P, S211H, S218I, S218Y, S389H, S389V, T163P, T282H, T291V, T291W, T341D, T48F, T48H, T48I, T48K, T48L, T48M, T48V, T48W, T48Y, V162L, V162T, V191A, V422M, W265L, Y79H, Y79N, Y79S o Y79W.

El polipéptido puede comprender además al menos una mutación adicional seleccionada entre: C226D, D164R, G179R, N159V, Q275V, T163R o T349Y.

Las secuencias totalmente complementarias a estos, así como también los ácidos nucleicos anteriores son "ácidos nucleicos de la invención", que codifican "polipéptidos de la invención".

Las secuencias de ácido nucleico de la invención pueden carecer de una secuencia de ácido nucleico homóloga que codifica una secuencia señal, secuencia de propeptina o secuencia promotora. Los ácidos nucleicos de la invención pueden comprender además una secuencia de ácido nucleico heteróloga, donde opcionalmente la secuencia de ácido nucleico heteróloga comprende, o consiste en, una secuencia que codifica una secuencia señal heteróloga, un marcador, un epítipo o una secuencia promotora. La secuencia de ácido nucleico heteróloga puede codificar una secuencia señal heteróloga que comprende o consiste en una extensión C-terminal y/o N-terminal para dirigirse a un

retículo endoplasmático (RE) o endomembrana, o a un sistema de endomembrana o retículo endoplasmático (RE) de una planta, o la secuencia heteróloga codifica un sitio de restricción. La secuencia promotora heteróloga puede comprender o consistir en un promotor inducible o constitutivo, o un promotor específico de un tipo celular, o un promotor específico de una planta, o un promotor específico del maíz.

5 La actividad fitasa puede comprender la catálisis del fitato (mio-inositol-hexafosfato) a inositol y fosfato inorgánico; o la hidrólisis del fitato (mio-inositol-hexafosfato); catalizar la hidrólisis de un fitato en un pienso, un producto alimenticio o una bebida, o un pienso, producto alimenticio o bebida que comprende un pienso animal basado en cereales, un mosto o una cerveza, una masa, una fruta o una verdura; o catalizar la hidrólisis de un fitato en una
10 célula microbiana, una célula fúngica, una célula de mamífero o una célula vegetal.

Las fitasas de la invención pueden ser termotolerantes y opcionalmente retener la actividad fitasa tras la exposición a una temperatura comprendida en el intervalo de aproximadamente -100°C a aproximadamente -80°C, de aproximadamente -80°C a aproximadamente -40°C, de aproximadamente -40°C a aproximadamente -20°C, de aproximadamente -20°C a aproximadamente 0°C, de aproximadamente 0°C a aproximadamente 37°C, de aproximadamente 0°C a aproximadamente 5°C, de aproximadamente 5°C a aproximadamente 15°C, de aproximadamente 15°C a aproximadamente 25°C, de aproximadamente 25°C a aproximadamente 37°C, de aproximadamente 37°C a aproximadamente 45°C, de aproximadamente 45°C a aproximadamente 55°C, de aproximadamente 55°C a aproximadamente 70°C, de aproximadamente 70°C a aproximadamente 75°C, de aproximadamente 75°C a aproximadamente 85°C, de aproximadamente 85°C a aproximadamente 90°C, de aproximadamente 90°C a aproximadamente 95°C, de aproximadamente 95°C a aproximadamente 100°C, de aproximadamente 100°C a aproximadamente 105°C, de aproximadamente 105°C a aproximadamente 110°C, de aproximadamente 110°C a aproximadamente 120°C, o de 95°C, 96°C, 97°C, 98°C, 99°C, 100°C, 101°C, 102°C, 103°C, 104°C, 105°C, 106°C, 107°C, 108°C, 109°C, 110°C, 111°C, 112°C, 113°C, 114°C, 115°C o superior. Las
15 fitasas de la invención pueden ser termotolerantes y opcionalmente retener la actividad a una temperatura comprendida en el intervalo de aproximadamente -100°C a aproximadamente -80°C, de aproximadamente -80°C a aproximadamente -40°C, de aproximadamente -40°C a aproximadamente -20°C, de aproximadamente -20°C a aproximadamente 0°C, de aproximadamente 0°C a aproximadamente 37°C, de aproximadamente 0°C a aproximadamente 5°C, de aproximadamente 5°C a aproximadamente 15°C, de aproximadamente 15°C a aproximadamente 25°C, de aproximadamente 25°C a aproximadamente 37°C, de aproximadamente 37°C a aproximadamente 45°C, de aproximadamente 45°C a aproximadamente 55°C, de aproximadamente 55°C a aproximadamente 70°C, de aproximadamente 70°C a aproximadamente 75°C, de aproximadamente 75°C a aproximadamente 85°C, de aproximadamente 85°C a aproximadamente 90°C, de aproximadamente 90°C a aproximadamente 95°C, de aproximadamente 95°C a aproximadamente 100°C, de aproximadamente 100°C a aproximadamente 105°C, de aproximadamente 105°C a aproximadamente 110°C, de aproximadamente 110°C a aproximadamente 120°C, o de 95°C, 96°C, 97°C, 98°C, 99°C, 100°C, 101°C, 102°C, 103°C, 104°C, 105°C, 106°C, 107°C, 108°C, 109°C, 110°C, 111°C, 112°C, 113°C, 114°C, 115°C o superior.

Las fitasas de la invención pueden ser termotolerantes o termoactivas a un pH ácido de aproximadamente pH 6,5, pH 6, pH 5,5, pH 5, pH 4,5, pH 4,0, pH 3,5, pH 3,0 o inferior, o el polipéptido fitasa es termotolerante o termoactivo a aproximadamente pH 7, pH 7,5, pH 8,0, pH 8,5, pH 9, pH 9,5, pH 10, pH 10,5, pH 11,0, pH 11,5, pH 12,0, pH 12,5 o inferior.

La invención proporciona casetes de expresión, vectores, vehículos de clonación, vectores de expresión, y vectores de clonación que comprenden un ácido nucleico de la invención, o que tienen incluido en su interior un ácido nucleico de la invención (que incluye ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de la invención), donde opcionalmente el casete de expresión, el vehículo de clonación o el vector comprende, o es, un vector viral, un plásmido, un fago, un fagémido, un cósmido, un fósmido, un bacteriófago o un cromosoma artificial, el vector viral comprende, o es, un vector adenoviral, vector retroviral, o un vector adenoviral asociado, o el casete de expresión, vehículo de clonación o vector comprende, o es, un cromosoma artificial bacteriano (BAC), un vector derivado del bacteriófago P1 (PAC), un cromosoma artificial de levadura (YAC) o un cromosoma artificial de mamífero (MAC).

La invención proporciona células transformadas, células transducidas, células hospedadoras y similares, que comprenden un ácido nucleico de la invención, o que en su interior tienen un ácido nucleico de la invención (que incluye ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de la invención), o el casete de expresión, vector, vehículo de clonación, vector de expresión, o vector de clonación de la invención, donde opcionalmente la célula es una célula bacteriana, una célula de mamífero, una célula fúngica, una célula de levadura, una célula de insecto o una célula vegetal.

Los animales transgénicos no humanos pueden comprender un ácido nucleico de la invención, o tener incluido en su interior un ácido nucleico de la invención (que incluye ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de la invención), o el casete de expresión, vector, vehículo de clonación, vector de expresión, o vector de clonación de la invención. El animal puede ser un ratón, una rata, una cabra, un conejo, una oveja, un cerdo o una vaca.

Las plantas transgénicas (incluyendo partes de la planta, por ejemplo, hojas, tallos, raíces o frutos, tratados o recolectados) o semillas pueden comprender un ácido nucleico de la invención, o que en su interior contienen un

ácido nucleico de la invención (que incluye ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de la invención), o el casete de expresión, vector, vehículo de clonación, vector de expresión, o vector de clonación de la invención. La planta puede ser una planta de maíz, una planta de patata, una planta de tomate, una planta de trigo una planta oleaginosa, una planta de colza, una planta de soja o una planta de tabaco. La semilla puede ser una semilla de
 5 maíz, un grano de trigo, una semilla oleaginosa, una semilla de colza, una semilla soja, un grano de palma, una semilla de girasol, una semilla de sésamo, una semilla de cacahuete o una semilla de planta de tabaco. Se incluyen plantas de cultivo, por ejemplo, maíz, alfalfa, girasol, *Brassica*, soja, caña de azúcar, algodón, cártamo, cacahuete, sorgo, trigo, avena, centeno, mijo, cebada, arroz, coníferas, cultivos de leguminosas, por ejemplo, guisante, judía y soja, tubérculos/raíces de almidón, por ejemplo, patata, batata, yuca, taro, caña de azúcar y remolacha azucarera y
 10 similares. La planta puede ser una planta de maíz, una planta de patata, una planta de tomate, una planta de trigo, una planta oleaginosa, una planta de colza, una planta de soja o una planta de tabaco, o una planta para forraje y/o para pienso para un animal, o para un animal rumiante, o la planta que puede ser o comprender la planta para forraje o para pienso es heno, maíz, mijo, soja, trigo, alforfón, cebada, alfalfa, centeno, una planta herbácea anual, sorgo, pasto del Sudán, pasto de Veldt o pasto de búfalo. La semilla puede ser una semilla de maíz, un grano de trigo,
 15 una semilla oleaginosa, una semilla de colza, una semilla de soja, un grano de palma, una semilla de girasol, una semilla de sésamo, un cacahuete o una semilla de cacahuete, una semilla de alfalfa, una semilla de algodón, una semilla de cártamo, una semilla de sorgo, un grano de avena, una semilla de centeno, una semilla de mijo, una semilla de cebada, un grano de arroz, una semilla de guisante, o una semilla de planta de tabaco, o la planta es maíz, alfalfa, girasol, *Brassica*, soja, caña de azúcar, algodón, cártamo, cacahuete, sorgo, trigo, cebada, centeno,
 20 mijo, cebada, arroz, coníferas, guisante, judía, soja, patata, batata, yuca, taro, caña de azúcar o remolacha azucarera.

Los oligonucleótidos antisentido pueden comprender un ácido nucleico que sea antisentido respecto a un ácido nucleico de la invención. Opcionalmente el oligonucleótido antisentido tiene una longitud de entre aproximadamente
 25 10 a 50, aproximadamente 20 a 60, aproximadamente 30 a 70, aproximadamente 40 a 80, aproximadamente 60 a 100 o aproximadamente 50 a 150 bases. Las ribozimas y/o ARNi (por ejemplo, ARNip o ARNm) pueden comprender secuencias antisentido que se desvelan en este documento.

Los métodos para inhibir la traducción del mensaje de una fitasa en una célula comprenden administrar a la célula o
 30 expresar en la célula un oligonucleótido antisentido de este tipo.

La invención proporciona polipéptidos aislados, sintéticos o recombinantes que comprenden

- (a) (i) una secuencia de aminoácidos codificada por los ácidos nucleicos de la invención;
 35 (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEC ID N^o: 2, donde el polipéptido comprende la mutación Q247H y tiene una actividad fitasa. Opcionalmente, el polipéptido comprende además al menos una mutación adicional seleccionada entre las que se enumeran en la Tabla 4, 5, 6, 7, 9 o cualquier combinación de las mismas.

El polipéptido tiene una termotolerancia superior o igual a la de la secuencia parental y una labilidad gástrica mayor que la de la secuencia parental.

Las identidades de las secuencias se pueden determinar mediante un análisis con un algoritmo de comparación de
 45 secuencias o mediante una inspección visual.

Como alternativa, dicha al menos una mutación es: A109V, A232P, A236H, A236T, A248L, A248T, A274F, A274I, A274L, A274T, A274V, A429P, C155Y, D139Y, E113P, F147Y, F194L, G171M, G171S, G257A, G257R, G353C, G395E, G395I, G395L, G395Q, G395T, G67A, H263P, H272W, I107H, I107P, I108A, I108Q, I108R, I108S, I108Y, I174F, I174P, I427G, I427S, I427T, K151H, K151P, L126R, L146R, L146T, L150T, L150Y, L157C, L157P, L167S, L192F, L216T, L235I, L244S, L269I, L269T, L296T, L379S, L379V, L50W, M51A, M51G, M51L, N148K, N148M, N148R, N161K, N266P, N339E, N348K, N348W, P100A, P145L, P149L, P149N, P217D, P217G, P217L, P217S, P254S, P269L, P343E, P343I, P343L, P343N, P343R, P343V, Q137F, Q137L, Q137V, Q137Y, Q246W, Q275H, Q309P, Q377R, Q381S, Q86H, S102A, S102Y, S173G, S173H, S173V, S197G, S208P, S211H, S218I, S218Y, S389H, S389V, T163P, T282H, T291V, T291W, T341D, T48F, T48H, T48I, T48K, T48L, T48M, T48V, T48W, T48Y, V162L, V162T, V191A, V422M, W265L, Y79H, Y79N, Y79S o Y79W.

El polipéptido puede comprender además al menos una mutación adicional seleccionada entre: C226D, D164R, G179R, N159V, Q275V, T163R o T349Y.

Los polipéptidos termotolerantes de acuerdo con la invención pueden retener actividad, por ejemplo, una actividad fitasa, tras la exposición a una temperatura comprendida en el intervalo de aproximadamente -100°C a aproximadamente -80°C, de aproximadamente -80°C a aproximadamente -40°C, de aproximadamente -40°C a aproximadamente -20°C, de aproximadamente -20°C a aproximadamente 0°C, de aproximadamente 0°C a

aproximadamente 5°C, de aproximadamente 5°C a aproximadamente 15°C, de aproximadamente 15°C a aproximadamente 25°C, de aproximadamente 25°C a aproximadamente 37°C, de aproximadamente 37°C a aproximadamente 45°C, de aproximadamente 45°C a aproximadamente 55°C, de aproximadamente 55°C a aproximadamente 70°C, de aproximadamente 70°C a aproximadamente 75°C, de aproximadamente 75°C a aproximadamente 85°C, de aproximadamente 85°C a aproximadamente 90°C, de aproximadamente 90°C a aproximadamente 95°C, de aproximadamente 95°C a aproximadamente 100°C, de aproximadamente 100°C a aproximadamente 105°C, de aproximadamente 105°C a aproximadamente 110°C, de aproximadamente 110°C a aproximadamente 120°C, o de 95°C, 96°C, 97°C, 98°C, 99°C, 100°C, 101°C, 102°C, 103°C, 104°C, 105°C, 106°C, 107°C, 108°C, 109°C, 110°C, 111°C, 112°C, 113°C, 114°C, 115°C o superior.

Los polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos de la invención pueden carecer de una secuencia señal homóloga (péptido líder) o secuencia de proproteína. Pueden comprender además una secuencia señal heteróloga (péptido líder). La secuencia heteróloga puede comprender o consistir en una secuencia señal heteróloga, o un marcador o un epítipo, o la secuencia heteróloga comprende un péptido de identificación. La secuencia señal heteróloga puede comprender o consistir en una extensión N-terminal y/o C-terminal para dirigirse hacia un retículo endoplasmático (RE) o endomembrana, o hacia un retículo endoplasmático (RE) o sistema endomembrana de una planta, o la secuencia de aminoácidos heteróloga puede comprender o consistir en un sitio de direccionamiento de la enzima. El polipéptido puede comprender además residuos de aminoácidos adicionales entre una secuencia señal (secuencia líder o péptido líder) y la enzima.

La actividad fitasa de cualquier polipéptido de la invención puede comprender una actividad específica: a aproximadamente 37 °C en el intervalo de aproximadamente 100 a aproximadamente 1000 unidades por miligramo de proteína; o, de aproximadamente 500 a aproximadamente 750 unidades por miligramo de proteína; o, a 37 °C en el intervalo de aproximadamente 500 a aproximadamente 1200 unidades por miligramo de proteína; o, a 37 °C en el intervalo de aproximadamente 750 a aproximadamente 1000 unidades por miligramo de proteína. La actividad de la fitasa termotolerante comprende una actividad específica después de exposición a una temperatura a aproximadamente 37 °C en el intervalo de aproximadamente 100 a aproximadamente 1000 unidades por miligramo de proteína; o, una actividad específica de aproximadamente 500 a aproximadamente 750 unidades por miligramo de proteína. Como alternativa, la actividad fitasa termoestable comprende una actividad específica a 37 °C en el intervalo de aproximadamente 500 a aproximadamente 1200 unidades por miligramo de proteína; o, una actividad específica a 37 °C en el intervalo de aproximadamente 750 a aproximadamente 1000 unidades por miligramo de proteína. La actividad específica puede estar en condiciones que comprenden una temperatura de aproximadamente 37 °C en el intervalo de aproximadamente 100 a aproximadamente 1000 unidades por miligramo de proteína; o, una actividad específica de aproximadamente 500 a aproximadamente 750 unidades por miligramo de proteína. La actividad fitasa termoestable puede comprender una actividad específica a 37 °C en el intervalo de aproximadamente 500 a aproximadamente 1200 unidades por miligramo de proteína; o una actividad específica a 37 °C en el intervalo de aproximadamente 750 a aproximadamente 1000 unidades por miligramo de proteína.

El polipéptido de la invención puede estar glucosilado o puede comprender al menos un sitio de glucosilación. Opcionalmente, la glucosilación es una glucosilación ligada a N o una glucosilación ligada a O, y opcionalmente el polipéptido se glucosila después de expresarse en una levadura, la cual es opcionalmente una *P. pastoris* o una *S. pombe*.

El polipéptido puede conservar una actividad fitasa en condiciones que comprenden un pH de aproximadamente 6,5, pH 6, pH 5,5, pH 5, pH 4,5, pH 4,0, pH 3,5, pH 3,0 o más bajo (más ácido). Como alternativa, un polipéptido de la invención puede conservar una actividad fitasa en condiciones que comprenden un pH de aproximadamente 7,5, pH 8, pH 8,5, pH 9, pH 9,5, pH 10,0, pH 10,5, pH 11,0, pH 11,5, pH 12, pH 12,5 o más alto (más básico).

La invención proporciona preparaciones de proteína que comprenden un polipéptido de la invención, donde la preparación de proteína comprende un líquido, una pasta espesa, un polvo, un aerosol, una suspensión, una composición/formulación liofilizada, un sólido, un comprimido recubierto con película, una píldora, un implante, un gel; o una formulación farmacéutica, un alimento, un pienso, un complemento de alimentos, un complemento de piensos, un aditivo de alimentos, un aditivo de piensos, un complemento nutricional o un complemento dietético de los mismos.

La invención proporciona heterodímeros que comprenden un polipéptido de la invención, y un segundo dominio. Opcionalmente, el segundo dominio es un polipéptido y el heterodímero es una proteína de fusión, y opcionalmente el segundo dominio es un epítipo o una etiqueta.

La invención proporciona polipéptidos inmovilizados que comprenden un polipéptido de la invención. El polipéptido inmovilizado puede comprender un homodímero o un heterodímero de la invención. Opcionalmente, el polipéptido está inmovilizado sobre o dentro de una célula, una vesícula, un liposoma, una película, una membrana, un metal, una resina, un polímero, una cerámica, un vidrio, un microelectrodo, una partícula grafitica, una perla, un gel, una placa, una matriz, un tubo capilar, un cristal, un comprimido, una píldora, una cápsula, un polvo, un aglomerado, una superficie o una estructura porosa. En un aspecto, la invención proporciona matrices (por ejemplo micromatrices) que comprenden un polipéptido inmovilizado, donde el polipéptido comprende el polipéptido de la invención, o el

heterodímero de la invención, o el ácido nucleico de la invención, o una combinación de los mismos.

Los anticuerpos aislados, sintéticos o recombinantes, pueden unirse específicamente a un polipéptido de la invención o a un polipéptido codificado por el ácido nucleico de la invención. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal. Los hibridomas pueden comprender un anticuerpo de este tipo.

Los métodos para producir un polipéptido recombinante comprenden: (a) proporcionar un ácido nucleico, donde el ácido nucleico comprende una secuencia de la invención; y (b) expresar el ácido nucleico de (a) en condiciones que permitan la expresión del polipéptido, produciendo de esta manera un polipéptido recombinante. Opcionalmente el método también comprende transformar una célula hospedadora con el ácido nucleico de (a) seguido por la expresión del ácido nucleico de (a), produciendo de este modo el polipéptido recombinante en una célula hospedadora transformada. El ácido nucleico puede unirse operativamente a un promotor antes de transformarlo en una célula hospedadora.

Los métodos para identificar un polipéptido que tiene actividad fitasa comprenden: (a) proporcionar el polipéptido de la invención; (b) proporcionar un sustrato fitasa; y (c) poner en contacto el polipéptido, o un fragmento, o una variante del mismo, de (a) con el sustrato de (b) y detectar un aumento en la cantidad de sustrato o una disminución en la cantidad de producto de reacción, donde una disminución en la cantidad de sustrato o un aumento en la cantidad de producto de reacción detecta un polipéptido que tiene una actividad fitasa.

Los métodos para identificar un sustrato fitasa comprenden: (a) proporcionar el polipéptido de la invención; (b) proporcionar un sustrato de ensayo; y (c) poner en contacto el polipéptido de (a) con el sustrato de ensayo de (b) y detectar un aumento en la cantidad de sustrato o una disminución en la cantidad de producto de reacción, donde una disminución en la cantidad de sustrato o un aumento en la cantidad de producto de reacción identifica el sustrato de ensayo como un sustrato fitasa.

Los métodos para determinar si un compuesto se une específicamente a un polipéptido comprenden: (a) expresar un ácido nucleico, o un vector que comprenda el ácido nucleico, en condiciones que permitan la traducción del ácido nucleico en un polipéptido, donde el ácido nucleico comprende una secuencia de la invención; (b) poner en contacto el polipéptido con el compuesto de ensayo; y (c) determinar si el compuesto de ensayo se une específicamente al polipéptido, determinando de este modo que el compuesto se une específicamente al polipéptido.

Los métodos para identificar un modulador de una actividad fitasa comprenden: (a) proporcionar el polipéptido fitasa de la invención; (b) proporcionar un compuesto de ensayo; (c) poner en contacto el polipéptido de (a) con el compuesto de ensayo de (b) y medir una actividad de la fitasa, donde un cambio en la actividad fitasa medido en presencia del compuesto de ensayo en comparación con la actividad en ausencia del compuesto de ensayo proporciona una determinación de que el compuesto de ensayo modula la actividad fitasa, donde opcionalmente la actividad fitasa se mide proporcionando un sustrato fitasa y detectando un aumento en la cantidad de sustrato o una disminución en la cantidad de un producto de reacción. Opcionalmente una disminución en la cantidad de sustrato o un aumento en la cantidad de producto de reacción con el compuesto de ensayo en comparación con la cantidad de sustrato o producto de reacción sin el compuesto de ensayo identifica el compuesto de ensayo como un activador de la actividad fitasa. Opcionalmente, un aumento en la cantidad de sustrato o una disminución en la cantidad de producto de reacción con el compuesto de ensayo en comparación con la cantidad de sustrato o producto de reacción sin el compuesto de ensayo identifica al compuesto de ensayo como un inhibidor de la actividad fitasa.

La invención proporciona métodos para hidrolizar un hexafosfato de inositol en inositol y fosfato inorgánico que comprende: (a) proporcionar un polipéptido que tenga una actividad fitasa, donde el polipéptido comprenda la secuencia de aminoácidos de la invención, o, un polipéptido codificado por el ácido nucleico de la invención; (b) proporcionar una composición que comprenda hexafosfato de inositol; y (c) poner en contacto el polipéptido de (a) con la composición de (b) en condiciones en las que el polipéptido hidroliza el hexafosfato de inositol para producir inositol y fosfato inorgánico. Opcionalmente, las condiciones comprenden una temperatura de entre aproximadamente 37 °C y aproximadamente 70 °C, entre aproximadamente 50 °C y aproximadamente 80 °C, o entre aproximadamente 60 °C y aproximadamente 90 °C, y opcionalmente la composición comprende un ácido fítico.

La invención proporciona métodos para el desgomado de aceite que comprenden: (a) proporcionar un polipéptido que tenga una actividad fitasa, donde el polipéptido comprenda una secuencia de aminoácidos de la invención, o, un polipéptido codificado por el ácido nucleico de la invención; (b) proporcionar una composición que comprenda un aceite vegetal; y (c) poner en contacto el polipéptido de (a) y el aceite vegetal de (b) en condiciones en las que el polipéptido pueda escindir un enlace inositol-fosfato inorgánico, realizando de este modo el desgomado del aceite vegetal.

La invención proporciona métodos para producir un pienso o un alimento, o un completo para piensos o alimentos, o un aditivo para piensos o alimentos, o un complemento nutricional, o un complemento dietético, que comprenden: (a) transformar una planta, una parte de la planta o una célula vegetal con un polinucleótido que codifique un polipéptido enzimático fitasa, donde la fitasa comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la invención, o, un polipéptido codificado por el ácido nucleico de la invención; (b) cultivar la planta, parte de la planta o

célula vegetal en condiciones en las que se exprese la enzima fitasa; y (c) convertir la planta, partes de la planta o célula vegetal en una composición adecuada para un alimento, un pienso, un complemento para alimentos, un complemento para piensos, un aditivo para alimentos, un aditivo para piensos, un complemento nutricional o un complemento dietético, o añadir la planta cultivada, parte de la planta o célula vegetal a un alimento, un pienso, un
 5 complemento para alimentos, un complemento para piensos, un aditivo para alimentos, un aditivo para piensos, un complemento para piensos, un complemento nutricional o un complemento dietético, produciendo por lo tanto un alimento, un pienso, un complemento para alimentos, un complemento para piensos, un aditivo para alimentos, un aditivo para piensos, un aditivo para piensos, un complemento nutricional o un complemento dietético. Opcionalmente, el polinucleótido está contenido en un vector de expresión y opcionalmente el vector comprende una secuencia de control de expresión
 10 que puede expresar el ácido nucleico en una célula vegetal. Opcionalmente, el alimento, pienso, complemento para alimentos, complemento para piensos, aditivo para alimentos, aditivo para piensos, complemento nutricional o complemento dietético es para un animal. El animal puede ser un animal monogástrico, opcionalmente un rumiante. El alimento, pienso, complemento para alimentos, complemento para piensos, aditivo para alimentos, aditivo para piensos, complemento nutricional o complemento dietético puede ser en forma de una matriz de liberación, un
 15 gránulo, un comprimido, un gel, un líquido, un aerosol, un grano molido o un polvo. La enzima fitasa puede estar glucosilada para proporcionar termotolerancia o termoestabilidad en condiciones de granulación. La matriz de liberación puede ser formada granulando una mezcla que comprende un germen de grano y la enzima fitasa para producir una partícula. Opcionalmente, los gránulos se fabrican en condiciones que comprenden la aplicación de vapor. Esas condiciones pueden comprender la aplicación de una temperatura superior a 80 °C durante
 20 aproximadamente 5 minutos.

El gránulo puede comprender una enzima fitasa que comprende una actividad específica de al menos 350 a aproximadamente 900 unidades por miligramo de enzima.

25 La invención proporciona métodos no terapéuticos para administrar un complemento enzimático fitasa a un animal o a un ser humano, donde dicho método comprende: (a) preparar una matriz comestible de liberación que comprenda un vehículo comestible y una enzima fitasa que comprenda un polipéptido que comprenda la secuencia de aminoácidos de la invención, donde la matriz dispersa y libera fácilmente la enzima fitasa cuando se pone en un medio acuoso y (b) administrar la matriz comestible de liberación enzimática al animal o ser humano. Opcionalmente
 30 la matriz comestible de liberación comprende un vehículo comestible granulado, y puede ser en forma de gránulos, comprimidos, geles, líquidos, aerosoles o polvos. El vehículo comestible puede comprender un vehículo seleccionado de un grupo que consiste en germen de grano, heno, alfalfa, agróstide, cáscara de soja, harina de semilla de girasol, harina de maíz, harina de soja y harina de trigo. Opcionalmente, el vehículo comestible comprende germen de grano que se usa como aceite.

35 La invención proporciona un alimento, un pienso, un complemento para alimentos, un complemento para piensos, un aditivo para alimentos, un aditivo para piensos, un complemento nutricional o un complemento dietético, para un animal o un ser humano, que comprende el polipéptido de la invención, o un homodímero o heterodímero de la invención. Opcionalmente, el polipéptido está glucosilado. La actividad fitasa puede ser termotolerante o
 40 termoestable. El alimento, pienso, complemento para alimentos, complemento para piensos, aditivo para alimentos, aditivo para piensos, complemento nutricional o complemento dietético puede elaborarse en forma de gránulo, píldora, comprimido, cápsula, gel, comprimido recubierto con película, aerosol, polvo, formulación liofilizada, formulación farmacéutica, en forma líquida, como una suspensión o pasta espesa, o se produce usando aditivos revestidos con polímero, o se elabora en forma granulada, o se produce mediante secado por pulverización.

45 La invención proporciona una matriz (o matrices) de liberación enzimática, comestible o que puede absorberse, que comprende el polipéptido de la invención, o un homodímero o heterodímero de la invención; donde opcionalmente el polipéptido está glucosilado, y opcionalmente la actividad fitasa es termotolerante o termoestable. Esta matriz de liberación puede comprender un gránulo, o la matriz de liberación enzimática, comestible o que puede absorberse,
 50 se elabora en forma de gránulo, píldora, comprimido, cápsula, gel, comprimido recubierto con película, aerosol, polvo, formulación liofilizada, formulación farmacéutica, forma líquida, como una suspensión o pasta espesa, o se produce usando aditivos revestidos con polímero o se elabora en forma granulada, o se produce mediante secado por pulverización.

55 La invención proporciona gránulos comestibles o que pueden absorberse que comprenden un vehículo granulado comestible o que puede absorberse y el polipéptido de la invención, o un homodímero o heterodímero de la invención. Opcionalmente, el polipéptido está glucosilado y opcionalmente la actividad fitasa es termotolerante o termoestable. El gránulo puede ser elaborado en forma de gránulo, o como una píldora, comprimido, cápsula, gel,
 60 comprimido recubierto con película, aerosol, polvo, formulación liofilizada, formulación farmacéutica, forma líquida o como una suspensión o pasta espesa, o se produce usando aditivos revestidos con polímero o se elabora en forma granulada, o se produce mediante secado por pulverización.

La invención proporciona harinas de soja que comprenden un polipéptido de la invención, o un homodímero o heterodímero de la invención, opcionalmente elaborado como un gránulo, píldora, comprimido, cápsula, gel,
 65 comprimido recubierto con película, aerosol, polvo, formulación liofilizada o en forma líquida.

- Los métodos para aumentar la resistencia de un polipéptido fitasa a la inactivación enzimática en un sistema digestivo de un animal comprenden realizar la glucosilación de un polipéptido fitasa que comprende el polipéptido de la invención, aumentando de esta manera la resistencia del polipéptido fitasa a la inactivación enzimática en un sistema digestivo de un animal. Opcionalmente, la glucosilación es N-glucosilación y, opcionalmente, el polipéptido fitasa está glucosilado como resultado de la expresión *in vivo* de un polinucleótido que codifica la fitasa en una célula. Una célula de este tipo puede ser una célula eucariota, una célula fúngica, una célula vegetal o una célula de mamífero.
- La invención proporciona métodos para procesar granos de maíz y de sorgo que comprenden: (a) proporcionar un polipéptido de la invención; (b) proporcionar una composición que comprenda un licor de maceración de maíz o un licor de maceración de sorgo; y (c) poner en contacto el polipéptido de (a) en la composición de (b) en condiciones en las que el polipéptido pueda escindir un enlace inositol-fosfato inorgánico.
- La invención proporciona composiciones farmacéuticas o formulaciones dietéticas que comprenden un polipéptido o un heterodímero de la invención; donde opcionalmente el polipéptido está glucosilado, y opcionalmente la actividad fitasa es termotolerante o termoestable. La composición farmacéutica o una formulación dietética puede formularse como gránulo, píldora, comprimido, cápsula, gel, comprimido recubierto con película, aerosol, polvo, loción o forma líquida, o se produce usando aditivos revestidos con polímeros, o como un implante, o se elabora en forma granulada, o se produce mediante secado por pulverización.
- La invención proporciona composiciones que comprenden un polipéptido o heterodímero de la invención; y (b) cualquier producto como se indica en la Tabla 2, o cualquiera de las composiciones enumeradas en la Tabla 1, donde opcionalmente el polipéptido está glucosilado, y opcionalmente la actividad fitasa es termotolerante o termoestable.
- Una unidad de comida individual lista para consumir (MRE, *Meal Ready to Eat*), una bebida o un agente hidratante puede comprender un polipéptido o un heterodímero de la invención; donde opcionalmente el polipéptido está glucosilado, y opcionalmente la actividad fitasa es termotolerante o termoestable.
- La invención proporciona métodos para mejorar (retrasar el progreso de, tratar o prevenir) la osteoporosis que comprenden administrar a un individuo que lo necesite una cantidad eficaz (dosificación) de una composición que comprenda un polipéptido o heterodímero de la invención; donde opcionalmente el polipéptido está glucosilado, y opcionalmente la actividad fitasa es termotolerante o termoestable.
- La invención proporciona métodos para incrementar la labilidad gástrica de una fitasa que comprenden proporcionar un polipéptido de la invención; y reemplazar uno o más aminoácidos en la secuencia que codifica el polipéptido con arginina, histidina, prolina, leucina, serina, treonina o tirosina.
- Los métodos para alterar al menos dos propiedades diferentes de una enzima, según se describe detalladamente en el Ejemplo 2 más adelante, comprenden (a) proporcionar un polipéptido con una actividad enzimática; (b) crear variantes del polipéptido de (a), donde cada variante tiene un único cambio de aminoácido respecto al polipéptido de (a); (c) explorar las variantes de (b) para las dos propiedades diferentes; (d) seleccionar las variantes deseadas de (c) e identificar el cambio de aminoácido único en cada variante seleccionada; (e) crear nuevas variantes que comprendan diferentes combinaciones de los cambios de aminoácidos únicos seleccionados de (d); (f) explorar las variantes de (e) para las dos propiedades alteradas; y (g) seleccionar las variantes deseadas de (f) con las dos propiedades alteradas. Los métodos alternativos para alterar al menos dos propiedades diferentes de una enzima comprenden (a) proporcionar un polipéptido con una actividad enzimática; (b) crear variantes del polipéptido de (a), donde cada variante tiene un único cambio de aminoácido respecto al polipéptido de (a); (c) explorar las variantes de (b) para una propiedad alterada; (d) explorar las variantes de (b) para otra propiedad alterada; (e) seleccionar las variantes deseadas de (c) y (d) e identificar el cambio de aminoácido único en cada variante seleccionada; (f) crear nuevas variantes que comprendan diferentes combinaciones de los cambios de aminoácidos únicos seleccionados de (c) y (d); (g) explorar las variantes de (f) para las dos propiedades alteradas; y (h) seleccionar las variantes deseadas de (g) con las dos propiedades alteradas. Algunos métodos ilustrativos para crear las variantes se basan en la evolución de GSSM, evolución de GeneReassembly y/o evolución de TMCA.
- Los métodos para desacoplar la estabilidad gástrica de la termotolerancia de una fitasa, según se describe detalladamente en el Ejemplo 2 más adelante, comprenden (a) proporcionar un polipéptido con una actividad fitasa; (b) crear fitasas variantes del polipéptido de (a), donde cada variante tiene un único cambio de aminoácido respecto al polipéptido de (a); (c) explorar las fitasas variantes de (b) para la estabilidad gástrica alterada y la termotolerancia alterada; (d) seleccionar las variantes de (c) con estabilidad gástrica y termotolerancia deseadas e identificar el cambio de aminoácido único en cada variante seleccionada; (e) crear nuevas fitasas variantes que comprendan diferentes combinaciones de los cambios de aminoácidos únicos seleccionados de (d); (f) explorar las variantes de (e) para la estabilidad gástrica alterada y la termotolerancia alterada; y (g) seleccionar las variantes deseadas de (f) con la estabilidad gástrica y la termotolerancia deseadas. Los métodos alternativos para desacoplar la estabilidad gástrica de la termotolerancia de una fitasa comprenden (a) proporcionar un polipéptido con una actividad fitasa; (b) crear fitasas variantes del polipéptido de (a), donde cada variante tiene un único cambio de aminoácido respecto al

polipéptido de (a); (c) explorar las fitasas variantes de (b) para la estabilidad gástrica alterada; (d) explorar las fitasas variantes de (b) para la termotolerancia alterada; (e) seleccionar las variantes de (c) y (d) con la estabilidad gástrica o termotolerancia deseada e identificar el cambio de aminoácido único en cada variante seleccionada; (f) crear nuevas fitasas variantes que comprendan diferentes combinaciones de los cambios de aminoácidos únicos
 5 seleccionados de (c) y (d); (g) explorar las variantes de (f) para la estabilidad gástrica alterada y la termotolerancia alterada; y (h) seleccionar las variantes de (g) con la estabilidad gástrica y la termotolerancia deseadas. Algunos métodos ilustrativos para crear las variantes se basan en la evolución de GSSM, evolución de GeneReassembly y/o evolución de TMCA. La invención proporciona fitasas ilustrativas para su uso en los métodos. Algunas mutaciones
 10 ilustrativas que desacoplan la estabilidad gástrica de la termotolerancia son, por ejemplo, las mutaciones enumeradas en la Tabla 4, 5, 6, 7, 9 o cualquiera de sus combinaciones.

La invención proporciona fitasas que son lábiles a nivel gástrico y termotolerantes, que se describen detalladamente en el Ejemplo 2 más adelante, donde la fitasa se degrada completamente en fluido gástrico estimulado (FGS) en
 15 menos de 10 minutos, menos de 8 minutos, menos de 6 minutos, menos de 4 minutos o menos de 2 minutos, y la fitasa retiene la actividad tras la exposición a una temperatura comprendida en el intervalo de aproximadamente 75°C a aproximadamente 85°C, de aproximadamente 85°C a aproximadamente 90°C, de aproximadamente 90°C a aproximadamente 95°C, o de aproximadamente 80°C a aproximadamente 86°C, por ejemplo, las fitasas de la
 20 invención como las que se describen detalladamente en el Ejemplo 2 más adelante. En un aspecto, las fitasas lábiles a nivel gástrico y termo tolerantes de la invención se degradan completamente en fluido gástrico estimulado (FGS) en menos de 4 minutos y la fitasa retiene la actividad tras la exposición a una temperatura comprendida en el intervalo de aproximadamente 80°C a aproximadamente 86°C.

En las reivindicaciones adjuntas se exponen otros aspectos de la invención.

25 Los detalles de uno o más aspectos de la invención se exponen en los dibujos adjuntos y en la siguiente descripción. Otras características, objetos y ventajas de la invención se pondrán de manifiesto a partir de la descripción, dibujos y reivindicaciones.

30 Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos son ilustrativos de aspectos de la invención y no pretenden limitar el alcance de la invención como se incluye en las reivindicaciones.

35 La Figura 1 ilustra un resumen de actividad residual de los polipéptidos purificados de la invención, secuencias ejemplares de mutación sencilla de la invención, después de tratamiento con calor a diversas temperaturas durante 30 minutos; donde la actividad fitasa se evalúa con un sustrato fluorescente, y las tasas se comparan con las tasas de cada muestra no tratada correspondiente; como se describe con detalle, más adelante, en el Ejemplo 1.

40 La Figura 2 ilustra un resumen de actividad residual de los polipéptidos purificados de la invención que comprenden mutaciones "combinadas" (fitasas que contienen mutaciones múltiples) de restos sencillos, después de tratamiento con calor en un termociclador; donde la actividad fitasa se evalúa con un sustrato fluorescente, y las tasas se comparan con las tasas de cada muestra no tratada correspondiente; como se resume en la Figura 1; como se describe con detalle, más adelante, en el Ejemplo 1.

45 La Figura 3 resume gráficamente los datos usados para generar el gráfico de la Figura 1, como se describe con detalle en el Ejemplo 1 más adelante.

50 La Figura 4 ilustra la secuencia de la fitasa parental SEC ID N°: 2 y las modificaciones de secuencia generadas mediante mutagénesis por saturación de sitio génico (GSSM, *Gene Site Saturation Mutagenesis*) seleccionadas para la construcción de la biblioteca GeneReassembly™; como se describe con detalle más adelante.

La Figura 5 ilustra fitasas ejemplares que tienen modificaciones de restos múltiples en la SEC ID N°: 2 parental, como se describe con detalle en el presente documento;

55 La Figura 6 ilustra fitasas ejemplares que tienen modificaciones de restos sencillos en la SEC ID N°: 2 parental, como se describe con detalle en el presente documento;

La Figura 7 ilustra esquemáticamente un ensayo fitasa ejemplar de la invención usando el sustrato fluorescente 4-metilumbeliferil fosfato (MeUMB-fosfato); como se describe más adelante con detalle en el Ejemplo 1.

60 La Figura 8 ilustra esquemáticamente un ensayo fitasa ejemplar de la invención que utiliza el sustrato fluorescente MeUMB-fosfato, como se describe más adelante con detalle en el Ejemplo 1.

65 La Figura 9 ilustra esquemáticamente el protocolo de una exploración de biblioteca ejemplar, como se describe en la Figura 8, como se describe más adelante con detalle en el Ejemplo 1.

La Figura 10 ilustra un proceso alcohólico ejemplar que puede incorporar el uso de las fitasas de la invención.

5 Las Figuras 11A y 11B ilustran resúmenes de termoestabilidad y labilidad en FGS de la fitasa *appA* (n° de acceso de GenBank M58708), intermedios de SEC ID N°: 2 de *appA*, y SEC ID N°: 2, según se describe detalladamente en el Ejemplo 2 más adelante.

10 La Figura 12 ilustra el efecto de un marcador de his sobre la estabilidad en FGS, que se determina mediante ensayos en FGS de versiones purificadas con el marcador de his y sin el marcador de his de la fitasa parental (SEC ID N°: 2), según se describe detalladamente en el Ejemplo 2 más adelante.

La Figura 13 ilustra la termotolerancia de variantes de SEC ID N°: 2 con eliminación de la glucosilación (Variantes GLY1 - GLY4) y dos controles de SEC ID N°: 2, según se describe detalladamente en el Ejemplo 2 más adelante.

15 La Figura 14 ilustra la estabilidad en FGS de SEC ID N°: 2-HIS y la variante SEC ID N°: 2-6X, según se describe detalladamente en el Ejemplo 2 más adelante.

La Figura 15 ilustra la pérdida de actividad en FGS de mutantes seleccionados a partir de la evolución de GSSM de la SEC ID N°: 2, según se describe detalladamente en el Ejemplo 2 más adelante.

20 La Figura 16 ilustra el efecto de diferentes aminoácidos sobre la labilidad en FGS, según se describe detalladamente en el Ejemplo 2 más adelante.

La Figura 17 ilustra los puntos importantes para la mutación de FGS, según se describe detalladamente en el Ejemplo 2 más adelante.

25 La Figura 18 ilustra la labilidad en FGS de la SEC ID N°: 2-HIS y la Variante O para diferentes dosis de pepsina, según se describe detalladamente en el Ejemplo 2 más adelante.

30 La Figura 19 ilustra la semivida de la SEC ID N°: 2-HIS y la Variante O, según se describe detalladamente en el Ejemplo 2 más adelante.

La Figura 20 ilustra la actividad residual de las variantes de fitasa lábiles en FGS, según se describe detalladamente en el Ejemplo 2 más adelante.

35 La Figura 21 ilustra la actividad específica de las fitasas variantes lábiles en FGS en comparación con la SEC ID N°: 2, según se describe detalladamente en el Ejemplo 2 más adelante.

En los diversos dibujos los mismos símbolos de referencia indican los mismos elementos.

40 Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a polipéptidos fitasa que tienen, comprenden, las modificaciones de restos específicos en la SEC ID N°: 2, como se ha descrito anteriormente, y a polinucleótidos que los codifican, (por ejemplo, que comprenden las modificaciones de los pares de bases específicos de la SEC ID N°: 1, como se ha descrito anteriormente), así como a métodos de uso de los polinucleótidos y polipéptidos. La Figura 6 ilustra fitasas ejemplares que tienen modificaciones de restos sencillos en la SEC ID N°: 2 parental y la Figura 5 ilustra fitasas ejemplares que tienen modificaciones de restos múltiples en la SEC ID N°: 2 parental.

50 La actividad fitasa de los polipéptidos de la invención puede incluir enzimas que tienen una actividad fitasa, por ejemplo, enzimas que pueden catalizar la degradación de fitato, por ejemplo, la catálisis de fitato (hexafosfato de mioinositol) a inositol y a fosfato inorgánico. Las fitasas de la invención incluyen enzimas termotolerantes y termorresistentes.

55 Las fitasas y polinucleótidos que codifican las fitasas de la invención son útiles en diversos procesos, métodos y composiciones. Por ejemplo, como se ha indicado anteriormente, una fitasa puede usarse en piensos y en complementos para piensos de animales, así como en tratamientos para degradar o eliminar el exceso de fitato del medio o de una muestra. Otros usos serán obvios para los expertos en la técnica basándose en las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, incluidas las comentadas anteriormente.

60 En un aspecto, las moléculas de fitasa de la invención- en solitario o en combinación con otros reactivos (incluyendo pero sin limitación enzimas, tales como proteasas, amilasas y similares) - se usan en el tratamiento de productos alimenticios, por ejemplo, para la prevención del sedimento residual de maíz no deseado, y en otras aplicaciones donde la hidrólisis de fitato es deseable.

65 En un aspecto, las moléculas de fitasa de la invención se usan para eliminar o disminuir la presencia de fitato no hidrolizado, especialmente donde el fitato no hidrolizado conduce a consecuencias problemáticas en procesos ex

vivo que incluyen -pero sin limitación- el procesamiento de productos alimenticios. En un aspecto, las moléculas de fitasa de la invención se usan en procedimientos como los descritos en el documento EP0321004-B1 (Vaara et al.), incluyendo etapas en el procesamiento de granos de almidón y sorgo mediante las cuales los granos duros se sumergen en agua para ablandarlos. Las sustancias hidrosolubles que lixivian durante este proceso forman parte de un licor de maceración de maíz, que se concentra por evaporación. El ácido fítico no hidrolizado en el licor de maceración de maíz, mayormente en forma de sales de calcio y magnesio, está asociado con fósforo y con depósitos de un sedimento residual no deseable con proteínas e iones metálicos. Este sedimento residual es problemático en la evaporación, transporte y almacenamiento del licor de maceración de maíz. Las moléculas de fitasa de la invención se usan para hidrolizar este sedimento residual.

En un aspecto, las fitasas de la invención pueden proporcionar un rendimiento comercial sustancialmente superior en comparación con las moléculas de fitasa previamente identificadas, por ejemplo, las moléculas de fitasa de origen fúngico. En un aspecto, las enzimas de la invención pueden tener aproximadamente 4400 U/mg, o mayor de aproximadamente entre 50 a 100, o 50 a 1000, o 100 a 4000 U/mg de proteína.

La invención también proporciona métodos para cambiar las características de una fitasa de la invención por mutagénesis u otro método, como se describe con detalle más adelante.

Generación y manipulación de ácidos nucleicos

La invención proporciona ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos y las fitasas de la invención. La invención también proporciona casetes de expresión, vectores, tales como, vector de expresión o de clonación, vehículos de clonación, tales como, un vector viral, un plásmido, un fago, un fagémido, un cósmido, un fósmido, un bacteriófago o un cromosoma artificial, que pueden comprender, o incluir en su interior, un ácido nucleico de la invención.

La invención también incluye métodos para descubrir nuevas secuencias de fitasa usando los ácidos nucleicos de la invención. También se proporcionan métodos para modificar los ácidos nucleicos de la invención mediante, por ejemplo, reensamblaje por ligamiento sintético, sistema de evolución dirigida optimizada y/o mutagénesis por saturación.

En un aspecto, la invención proporciona un género de ácidos nucleicos que son variantes de la SEC ID N°: 1 parental generadas sintéticamente; donde estos ácidos nucleicos de la invención tienen una identidad de secuencia de al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % con la SEC ID N°: 1 "parental" mutada como se ha analizado anteriormente.

Por referencia, la SEC ID N°: 1 parental es:

```

atgaaagcga tctaatccc attttatct ctctgattc cgtaacccc gcaatctgca 60
ttcgctcaga gtgagccgga gctgaagctg gaaagtgtgg tgattgtcag tcgtcatggt 120
gtgcgtgctc caaccaaggc cacgcaactg atgcaggatg tcacccaga cgcatggcca 180
acctggccgg taaaactggg tgagctgaca ccgcgcggtg gtgagctaat cgctatctc 240
ggacattact ggcgtcagcg tctgtagcc gacggattgc tgcctaaatg tggctccccg 300
cagtctggtc aggtcgcgat tattgtgat gtcgacgagc gtaccgtaa aacaggcgaa 360
gccttcgccc cggggctggc acctgactgt gcaataaccg tacataccca ggcagatacg 420
tccagtcccg atccgttatt taatcctcta aaaactggcg ttgccaact ggataacgcg 480
aacgtgactg acgcatcct cgagagggca ggagggtcaa ttgctgactt taccgggcat 540
tatcaaacgg cgttcgcca actggaacgg gtgctaatt tccgcaatc aaacttgtgc 600
cttaaacgtg agaaacagga cgaagctgt tcattaacgc aggcattacc atcggaactc 660
aaggtgagcg ccgactgtgt ctattaacc ggtgcggtaa gcctcgcac aatgctgacg 720
gagatatttc tctgcaaca agcacaggga atgccggagc cggggtgggg aaggatcacc 780
gattcacacc agtggaaacac ctgctaagt ttgcataacg cgcaattga ittgctacaa 840
cgcacgccag aggttgcccg cagcccgccc accccgttat tagatttgat caagacagcg 900
ttgacgcccc atccaccgca aaaacaggcg tatggtgtga cattaccac ttcagtgtcg 960
tttatcgccc gacacgatac taatctggca aatctcggcg gcgactgga gctcaactgg 1020
acgttcccg gtcagccgga taacacgccg ccaggtggtg aactggtgt tgaacgctgg 1080
cgtcggctaa gcgataacag ccagtggatt caggttgcg tggcttcca gactttacag 1140
cagatgcgtg ataaaacgcc gctgtcatta aatacggcg ccggagaggt gaaactgacc 1200
ctggcaggat gtgaagagcg aaatgcgcag ggcattgtgt cgttggcagg ttttacgcaa 1260
atcgtgaatg aagcacgcat accggcgtgc agttttaa 1299
    
```

Los ácidos nucleicos de la invención pueden prepararse, aislarse y/o manipularse, por ejemplo, mediante clonación y expresión de bibliotecas de ADNc, amplificación de ADN mensajero o genómico por PCR y similar. Al poner en

práctica los métodos de la invención, los genes homólogos pueden modificarse manipulando un ácido nucleico molde, como se describe en el presente documento. La invención puede llevarse a la práctica conjuntamente con cualquier método, protocolo o dispositivo conocido en la técnica, que se describen bien en la bibliografía científica y de patentes.

5 *Técnicas generales*

Los ácidos nucleicos usados para poner en práctica la invención, ya sea ARN, ARNi, ácido nucleico antisentido, ADNc, ADN genómico, vectores, virus o sus híbridos, pueden aislarse de una diversidad de fuentes, modificarse por ingeniería genética, amplificarse, y/o expresarse/generarse de manera recombinante. Los polipéptidos recombinantes generados a partir de estos ácidos nucleicos pueden aislarse o clonarse individualmente y pueden ensayarse para determinar una actividad deseada. Puede usarse cualquier sistema de expresión recombinante, incluyendo sistemas de expresión de células bacterianas, de mamíferos, de levaduras, de insectos o de plantas.

15 Como alternativa, estos ácidos nucleicos pueden sintetizarse *in vitro* mediante técnicas de síntesis química bien conocidas, como se describe, por ejemplo, en Adams (1983) J. Am. Chem. Soc. 105: 661; Belousov (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3440-3444; Frenkel (1995) Free Radic. Biol. Med. 19: 373-380; Blommers (1994) Biochemistry 33: 7886-7896; Narang (1979) Meth. Enzymol. 68: 90; Brown (1979) Meth. Enzymol. 68: 109; Beaucage (1981) Tetra. Lett. 22: 1859; Patente de Estados Unidos N° 4.458.066.

20 Las técnicas para la manipulación de ácidos nucleicos, tales como, por ejemplo, subclonación, sondas marcadoras (por ejemplo marcaje de cebadores al azar usando la polimerasa de Klenow, la traducción por cortes, amplificación), secuenciación, hibridación y similares, están bien descritas en la bibliografía científica y de patentes, véanse, por ejemplo, Sambrook, ed., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (2ª ED.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Ausubel, ed. John Wiley & Sons, Inc., Nueva York (1997); LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY: HYBRIDIZATION WITH NUCLEIC ACID PROBES, Part I. Theory and Nucleic Acid Preparation, Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993).

30 Otros medios útiles para obtener y manipular ácidos nucleicos utilizados para poner en práctica los métodos de la invención es la clonación a partir de muestras genómicas y, si se desea, identificar y volver a clonar insertos aislados o amplificados a partir de, por ejemplo, clones genómicos o clones de ADNc. Las fuentes de ácido nucleico utilizadas en los métodos de la invención incluyen genotecas o bibliotecas de ADNc contenidas en, por ejemplo, cromosomas artificiales de mamíferos (MAC), véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos 5.721.118; 6.025.155; cromosomas artificiales humanos, véase, por ejemplo, Rosenfeld (1997) Nat. Genet. 15: 333-335; cromosomas artificiales de levaduras (ACY); cromosomas artificiales bacterianos (BAC); cromosomas artificiales P1, véase, por ejemplo, Woon (1998) Genomics 50: 306-316; vectores derivados de P1 (PAC), véase, por ejemplo, Kern (1997) Biotechniques 23: 120-124; cósmidos, virus recombinantes, fagos o plásmidos.

40 En aspectos alternativos, las frases "ácido nucleico" o "secuencia de ácidos nucleicos" se refiere a un oligonucleótido, nucleótido, polinucleótido, o a un fragmento de cualquiera de estos, a ADN o ARN (por ejemplo, ARNm, ARNr, ARNt) de origen genómico o sintético que puede ser mono o bicatenario y que puede representar una cadena en sentido o antisentido, a un ácido nucleico peptídico (ANP), o a cualquier material similar a ADN o similar a ARN, natural o sintético en origen, incluyendo, por ejemplo ARNi, ribonucleoproteínas (por ejemplo, RNPi). El término incluye ácidos nucleicos, es decir, oligonucleótidos, que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales. El término también incluye estructuras similares a ácido nucleico con esqueletos sintéticos, véanse, por ejemplo, Mata (1997) Toxicol. Appl. Pharmacol. 144: 189-197; Strauss-Soukup (1997) Biochemistry 36: 8692-8698; Samstag (1996) Antisense Nucleic Acid Drug Dev 6: 153-156.

50 En un aspecto, los polinucleótidos recombinantes de la invención comprenden secuencias adyacentes a un ácido nucleico "estructural" al cual no es adyacente en su entorno natural. En un aspecto, los ácidos nucleicos representan el 5 % o más del número de insertos de ácido nucleico en una población de "moléculas estructurales" de ácido nucleico. Las "moléculas estructurales" de acuerdo con la invención incluyen ácidos nucleicos, tales como, vectores de expresión, ácidos nucleicos autorreplicantes, virus, ácidos nucleicos integrantes, y otros vectores o ácidos nucleicos usados para mantener o manipular un inserto de ácido nucleico de interés. En un aspecto, los ácidos nucleicos enriquecidos pueden representar el 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más del número de insertos de ácido nucleico en la población de moléculas estructurales recombinantes.

60 En un aspecto, un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención se ensambla en una fase apropiada con una secuencia líder capaz de dirigir la secreción del polipéptido traducido o su fragmento.

La invención proporciona proteínas de fusión y ácidos nucleicos que las codifican. Un polipéptido de la invención puede fusionarse a un péptido o polipéptido heterólogo, tal como péptidos de identificación N-terminales que proporcionan características deseadas, tales como estabilidad aumentada o purificación simplificada. Los péptidos y polipéptidos de la invención, también pueden sintetizarse y expresarse como proteínas de fusión con uno o más dominios adicionales unidos a ellas para, por ejemplo, producir un péptido más inmunógeno, para aislar más

fácilmente un péptido sintetizado de manera recombinante, para identificar y aislar anticuerpos y células B que expresan anticuerpos, y similares. Los dominios que facilitan la detección y purificación incluyen, por ejemplo, péptidos quelantes de metales tales como tramos de polihistidina y módulos de histidina-triptófano que permiten la purificación sobre metales inmovilizados, dominios de proteína A que permiten la purificación sobre inmunoglobulina inmovilizada, y el dominio utilizado en el sistema de purificación de extensión/afinidad de FLAGS (Immunex Corp, Seattle WA). La inclusión de secuencias conectoras escindibles, tales como el factor Xa o enteroquinasa (Invitrogen, San Diego CA) entre un dominio de purificación y el péptido o polipéptido que comprende un motivo para facilitar la purificación. Por ejemplo, un vector de expresión puede incluir una secuencia de ácido nucleico que codifique un epítipo unida a seis restos de histidina seguido de una tiorredoxina y un sitio de escisión de enteroquinasa (véase por ejemplo Williams (1995) *Biochemistry* 34: 1787-1797; Dobeli (1998) *Protein Expr. Purif.* 12: 404-414). Los restos de histidina facilitan la detección y purificación mientras que el sitio de escisión de enteroquinasa proporciona un medio para purificar el epítipo del resto de la proteína de fusión. La tecnología que pertenece a vectores que codifican proteínas de fusión, y la aplicación de proteínas de fusión, está bien descrita en la bibliografía científica y de patentes, véase, por ejemplo Kroll (1993) *DNA Cell. Biol.*, 12: 441-53.

En un aspecto, el término "aislado" significa que el material se elimina de su entorno original (es decir, el entorno natural si este es de origen natural). Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido de origen natural presente en un animal vivo no está aislado, pero el mismo polinucleótido o polipéptido, separado de algún o todos los materiales coexistentes en el sistema natural, está aislado. Dichos polinucleótidos pueden formar parte de un vector y/o dichos polinucleótidos o polipéptidos pueden formar parte de una composición, y aún estar aislados como tal en dicho vector o composición que no forma parte de este entorno natural. En un aspecto, el término "purificado" no requiere pureza absoluta; en su lugar, se considera como una definición relativa. Los ácidos nucleicos individuales obtenidos de una biblioteca se han purificado de manera convencional para una homogeneidad electroforética. Las secuencias obtenidas de estos clones no podrían obtenerse directamente de la biblioteca o del ADN humano total. Los ácidos nucleicos purificados de la invención se han purificado del ADN genómico restante en el organismo al menos 10^4 - 10^6 veces. En aspectos alternativos, el término "purificado" también incluye ácidos nucleicos que se han purificado del ADN genómico restante o de otras secuencias en una biblioteca u otro entorno en al menos un orden de magnitud, o como alternativa, de dos o tres órdenes, o de cuatro o cinco órdenes de magnitud.

30 *Secuencias de control transcripcionales y traduccionales*

La invención proporciona secuencias de ácido nucleico (por ejemplo, ADN) de la invención unidas operativamente a una secuencia (o secuencias) de control de la expresión (por ejemplo, transcripcionales o traduccionales), por ejemplo, promotores o potenciadores, para dirigir o modular la síntesis/expresión del ARN. La secuencia de control de la expresión puede estar en un vector de expresión. Promotores bacterianos ejemplares incluyen *lacI*, *lacZ*, T3, T7, *gpt*, *lambda PR*, PL y *trp*. Los promotores eucariotas ejemplares incluyen CMV inmediato temprano, HSV timidina quinasa, SV40 temprano y tardío, LTR de retrovirus y metalotioneína I de ratón.

Los promotores adecuados para expresar, o sobreexpresar, un polipéptido en bacterias incluyen los promotores *lac* o *trp* de *E. coli*, el promotor *lacI*, el promotor *lacZ*, el promotor T3, el promotor T7, el promotor *gpt*, el promotor *lambda PR*, el promotor *lambda PL*, promotores de operones que codifican enzimas glucolíticas tales como 3-fosfoglicerato quinasa (PGK), y el promotor de fosfatasa ácida. Los promotores eucariotas incluyen el promotor temprano inmediato del CMV, el promotor de HSV timidina quinasa, promotores de choque térmico, el promotor de SV40 temprano y tardío, LTR de retrovirus, y el promotor de metalotioneína I de ratón. También pueden usarse otros promotores conocidos que controlan la expresión de genes en células procariontas o eucariotas, o sus virus.

Vectores de expresión y vehículos de clonación

La invención proporciona sistemas de expresión, por ejemplo, casetes de expresión, vectores, vehículos de clonación y similares, que comprenden ácidos nucleicos de la invención, por ejemplo, secuencias que codifican las fitas de la invención, para la expresión, y sobreexpresión, de los polipéptidos de la invención (y ácidos nucleicos, por ejemplo, antisentido). Los vectores de expresión y los vehículos de clonación de la invención pueden comprender partículas virales, baculovirus, fagos, plásmidos, fagémidos, cósmidos, fósmidos, cromosomas artificiales bacterianos, ADN viral (por ejemplo, de la vacuna, adenovirus, virus de la viruela, pseudorrabia y derivados de SV40), cromosomas artificiales basados en P1, plásmidos de levadura, cromosomas artificiales de levadura, y cualquier otro vector específico de hospedadores específicos de interés (tales como *Bacillus*, *Aspergillus* y levaduras). Los vectores de la invención pueden incluir secuencias de ADN sintéticas, cromosómicas y no cromosómicas. Los expertos en la técnica conocen un gran número de vectores adecuados y se encuentran disponibles en el comercio. Los vectores ejemplares incluyen: bacterianos: vectores pQE (Qiagen), plásmidos pBluescript, vectores pNH, (vectores *lambda-ZAP* (Stratagene); *ptrc99a*, *pKK223-3*, *pDR540*, *pRIT2T* (Pharmacia); eucariotas: *pXT1*, *pSG5* (Stratagene), *pSVK3*, *pBPV*, *pMSG*, *pSVLSV40* (Pharmacia). Sin embargo puede usarse cualquier otro plásmido u otro vector siempre que sean replicables y viables en el hospedador. Con la presente invención pueden emplearse vectores con número de copias bajo o con número de copias elevado.

Como ejemplos representativos de vectores de expresión que pueden usarse pueden mencionarse partículas virales, baculovirus, fagos, plásmidos, fagémidos, cósmidos, fósmidos, cromosomas artificiales bacterianos, ADN

viral (por ejemplo, de la vacuna, adenovirus, virus de la viruela, pseudorrabia y derivados de SV40), cromosomas artificiales basados en P1, plásmidos de levadura, cromosomas artificiales de levadura, y cualquier otro vector específico de hospedadores específicos de interés (tales como *Bacillus*, *Aspergillus* y levaduras). Por tanto, por ejemplo, el ADN puede incluirse en una cualquiera de una diversidad de vectores de expresión para expresar un polipéptido. Dichos vectores incluyen secuencias de ADN sintéticas, cromosómicas y no cromosómicas. Los expertos en la técnica conocen un gran número de vectores adecuados y se encuentran disponibles en el comercio. Como ejemplo se proporcionan los siguientes vectores: bacterianos: vectores pQE (Qiagen), plásmidos pBluescript, vectores pNH, (vectores lambda-ZAP (Stratagene); ptrc99a, pKK223-3, pDR540, pRIT2T (Pharmacia); eucariotas: pXT1, pSG5 (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG, pSVLSV40 (Pharmacia). Sin embargo puede usarse cualquier otro plásmido u otro vector siempre que sean replicables y viables en el hospedador. Con la presente invención pueden emplearse vectores con número de copias bajo o con número de copias elevado.

Un vector ejemplar para su uso en la presente invención contiene un origen de replicación del factor f. El factor f (o factor de fertilidad) en *E. coli* es un plásmido que efectúa transferencia a alta frecuencia de sí mismo durante la conjugación y transferencia menos frecuente del propio cromosoma bacteriano. Un aspecto utiliza vectores de clonación, denominados "fósmidos" o vectores de cromosomas artificiales bacterianos (BAC). Estos derivan del factor f de *E. coli* que puede integrar establemente grandes segmentos de ADN genómico. Cuando se integra con ADN de una muestra ambiental no cultivada mixta, hace que sea posible conseguir grandes fragmentos genómicos en forma de una "biblioteca de ADN ambiental" estable.

Otro tipo de vector para su uso en la presente invención es un vector de cósmido. Los vectores de cósmidos se diseñaron en principio para clonar y propagar grandes segmentos de ADN genómico. La clonación en vectores de cósmidos se describe con detalle en "Molecular Cloning: A laboratory Manual" (Sambrook et al., 1989).

La secuencia de ADN en el vector de expresión está unida operativamente a una secuencia (o secuencias) de control de la expresión apropiada (promotor) para dirigir la síntesis del ARN. Los promotores bacterianos particulares incluyen *lacI*, *lacZ*, *T3*, *T7*, *gpt*, *lambda* P_R, P_L y *trp*. Los promotores eucariotas incluyen CMV inmediato temprano, HSV timidina quinasa, SV40 temprano y tardío, LTR de retrovirus y metalotioneína I de ratón. La selección del vector y promotor apropiado está bien dentro del nivel de experiencia en la técnica. El vector de expresión también contiene un sitio de unión al ribosoma para iniciar la traducción y un terminador de la transcripción. El vector también puede incluir secuencias apropiadas para amplificar la expresión. Pueden seleccionarse regiones promotoras de cualquier gen deseado usando vectores CAT (cloramfenicol transferasa) u otros vectores con marcadores de selección. Además, los vectores de expresión pueden contener uno o más genes marcadores de selección para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de células hospedadoras transformadas tales como dihidrofolato reductasa, o resistencia a neomicina para el cultivo de células eucariotas, o tetraciclina o resistencia a tetraciclina o ampicilina en *E. coli*.

En un aspecto, los casetes de expresión de la invención comprenden una secuencia de la invención y una secuencia de nucleótidos que puede afectar a la expresión de un gen estructural (es decir, una secuencia que codifica una proteína, tal como una fitasa de la invención) en un hospedador compatible con dichas secuencias. Los casetes de expresión incluyen al menos un promotor unido operativamente con la secuencia polipeptídica codificante; y, opcionalmente, con otras secuencias, por ejemplo, señales de terminación de la transcripción. También pueden usarse factores adicionales necesarios o útiles para efectuar la expresión, por ejemplo, potenciadores. En un aspecto, "unido operativamente", como se usa en el presente documento, se refiere a la unión de un promotor aguas arriba de una secuencia de ADN de tal manera que el promotor media la transcripción de la secuencia de ADN. Por tanto, los casetes de expresión también incluyen plásmidos, vectores de expresión, virus recombinantes, cualquier forma de vector de "ADN desnudo" recombinante y similar. En un aspecto, un "vector" comprende un ácido nucleico que puede infectar, transfectar, transducir, transitoria o permanentemente, una célula. Un vector puede ser un ácido nucleico desnudo, o un ácido nucleico formando complejos con proteínas o lípidos. Opcionalmente el vector comprende ácidos nucleicos y/o proteínas virales o bacterianas, y/o membranas (por ejemplo, una membrana celular, una envoltura lipídica viral, etc.). En un aspecto, los vectores incluyen, pero sin limitación, replicones (por ejemplo, replicones de ARN, bacteriófagos) a los cuales pueden unirse fragmentos de ADN y comenzar a replicarse. En un aspecto, los vectores incluyen, pero sin limitación, ARN, ARN o ADN circular o lineal autónomo autorreplicante (por ejemplo, plásmidos, virus y similares, véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.217.879), e incluye tanto plásmidos de expresión como de no expresión. Cuando un microorganismo recombinante o un cultivo celular se describe como hospedador de un "vector de expresión", esto incluye ADN circular y lineal extra-cromosómico y ADN que se ha incorporado en el cromosoma (o cromosomas) del hospedador. Cuando un vector se conserva en una célula hospedadora, las células pueden replicar establemente el vector durante la mitosis como una estructura autónoma, o se incorpora dentro del genoma del hospedador.

El vector de expresión puede comprender un promotor, un sitio de unión a ribosoma para el inicio de la traducción y un terminador de la transcripción. El vector también puede incluir secuencias apropiadas para amplificar la expresión. Los vectores de expresión de mamíferos pueden comprender un origen de replicación, cualquiera de los sitios de unión a ribosoma necesarios, un sitio de poliadenilación, sitios donantes y aceptores de corte y empalme, secuencias de la terminación transcripcional, y secuencias flanqueantes no transcritas en posición 5'. En algunos aspectos, pueden usarse las secuencias de ADN derivadas de los sitios de corte y empalme y de poliadenilación del

SV40 para proporcionar los elementos genéticos no transcritos necesarios.

En un aspecto, los vectores de expresión contienen uno o más genes marcadores de selección para permitir la selección de células hospedadoras que contienen el vector. Dichos marcadores de selección incluyen genes que codifican dihidrofolato reductasa, o genes que confieren resistencia a neomicina al cultivo de células eucariotas, genes que confieren resistencia a tetraciclina o a ampicilina en *E. coli*, y el gen TRP1 de *S. cerevisiae*. Las regiones promotoras pueden seleccionarse de cualquier gen deseado usando vectores de cloranfenicol transferasa (CAT) u otros vectores con marcadores de selección.

Los vectores para expresar el polipéptido o su fragmento en células eucariotas también pueden contener potenciadores para aumentar los niveles de expresión. Los potenciadores son elementos de ADN que actúan en cis, normalmente de aproximadamente 10 a aproximadamente 300 pb de longitud, que actúan sobre un promotor para aumentar su transcripción. Como ejemplos se incluyen el potenciador del SV40 en el lado tardío del origen de replicación de 100 pb a 270 pb, el potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación y los potenciadores de adenovirus.

Una secuencia de ADN puede insertarse en un vector mediante diversos procedimientos. En general, la secuencia de ADN se liga a la posición deseada en el vector después de la digestión del inserto y el vector con endonucleasas de restricción apropiadas. Como alternativa, pueden ligarse extremos romos tanto en el inserto como en el vector. En la técnica se conocen diversas técnicas de clonación, por ejemplo, como se describe en Ausubel y Sambrook. Se considera que dichos procedimientos y otros se encuentran dentro del ámbito de los expertos en la técnica.

El vector puede estar en forma de un plásmido, una partícula viral o un fago. Otros vectores incluyen secuencias de ADN cromosómicas, no cromosómicas y sintéticas, derivados de SV40; plásmidos bacterianos, ADN de fago, baculovirus, plásmidos de levadura, vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fago, ADN viral, tal como el virus de la vacuna, adenovirus, virus de la viruela y pseudorrabia. Sambrook describe, por ejemplo, una diversidad de vectores de clonación y expresión para su uso con hospedadores procariontes y eucariotas.

Los vectores bacterianos particulares que pueden usarse incluyen los plásmidos disponibles en el comercio que comprenden elementos genéticos del vector de clonación bien conocido pBR322 (ATCC 37017), pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia), GEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, Estados Unidos) pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen), pD10, psiX174 pBluescript II KS, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A (Stratagene), ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia), pKK232-8 y pCM7. Los vectores eucariotas particulares incluyen pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL (Pharmacia). Sin embargo, puede usarse cualquier otro vector siempre que sea replicable y viable en la célula hospedadora.

Células hospedadoras y células transformadas

La invención también proporciona una célula transformada que comprende una secuencia de ácido nucleico de la invención, por ejemplo, una secuencia que codifica una fitasa de la invención, o que comprende un casete de expresión, un vector, vehículo de clonación, vector de expresión, o vector de clonación de la invención. La célula hospedadora puede ser cualquiera de las células hospedadoras familiares para los expertos en la técnica, incluyendo células procariontes, células eucariotas, tales como células bacterianas, células fúngicas, células de levadura, células de mamífero, células de insecto o células vegetales. Las células bacterianas ejemplares incluyen cualquiera de las especies dentro de los géneros *Escherichia*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Lactococcus* y *Staphylococcus*, incluyendo, por ejemplo, *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens*. Como células fúngicas ejemplares se incluyen cualquiera de las especies de *Aspergillus*, incluida *Aspergillus niger*. Como células de levadura ejemplares se incluyen cualquier especie de *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o *Schwanniomyces* incluyendo *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, o *Schizosaccharomyces pombe*. Como células de insecto ejemplares se incluyen cualquiera de las especies de *Spodoptera* o *Drosophila*, incluyendo S2 de *Drosophila* y Sf9 de *Spodoptera*. Como células de insecto ejemplares se incluyen S2 de *Drosophila* y Sf9 de *Spodoptera*. Como células de levadura ejemplares se incluyen *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* o *Schizosaccharomyces pombe*. Como células de animales ejemplares se incluyen CHO, COS o melanoma de Bowes o cualquier línea celular humana o murina. La selección de un hospedador apropiado se encuentra dentro de las capacidades de los expertos en la técnica.

El vector puede introducirse en las células hospedadoras usando cualquiera de una diversidad de técnicas, incluyendo, transformación, transfección, transducción, infección viral, pistolas génicas, o transferencia de genes mediada por Ti. Como métodos particulares se incluyen transfección con fosfato de calcio, transfección mediada con DEAE-Dextrano, lipofección, o electroporación (Davis, L., Dibner, M., Bat-tey, I., Basic Methods in Molecular Biology, (1986)).

Cuando sea apropiado, las células hospedadoras modificadas por ingeniería genética pueden cultivarse en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para la activación de promotores, selección de transformantes o amplificación de los genes de la invención. Después de la transformación de una cepa hospedadora adecuada y el crecimiento de la cepa hospedadora hasta una densidad celular apropiada, el promotor

seleccionado puede inducirse por medios apropiados (por ejemplo, cambio de temperatura o inducción química) y las células pueden cultivarse durante un periodo adicional para permitirles producir el polipéptido deseado o fragmento del mismo.

5 Las células pueden recuperarse por centrifugación, pueden destruirse por medios físicos o químicos y el extracto bruto resultante se conserva para purificación adicional. Las células microbianas empleadas para la expresión de proteínas pueden destruirse mediante cualquier método conveniente, incluyendo ciclos de congelación/descongelación, tratamiento con ultrasonidos, interrupción mecánica, o uso de agentes de lisado celular. Dichos métodos son bien conocidos por los expertos en la técnica. El polipéptido expresado, o fragmento del mismo, puede recuperarse y purificarse a partir de cultivos de células recombinantes por métodos que incluyen precipitación con etanol o sulfato de amonio, extracción ácida, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía con fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía con hidroxipatita y cromatografía con lecitina. Las etapas de repliegamiento proteico pueden usarse, según sea necesario, para completar la configuración del polipéptido. Si se desea, para las etapas de purificación final puede emplearse cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

Las construcciones en células hospedadoras pueden usarse de manera convencional para producir el producto génico codificado por la secuencia recombinante. Dependiendo del hospedador empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos producidos por células hospedadoras que contienen el vector pueden estar glucosilados o pueden estar no glucosilados. Los polipéptidos de la invención también pueden incluir o no un resto de aminoácido de metionina inicial.

Los sistemas de traducción acelulares también pueden emplearse para producir un polipéptido de la invención. Los sistemas de traducción acelulares pueden usar ARNm transcritos a partir de una construcción de ADN que comprenda un promotor unido operativamente a un ácido nucleico que codifica el polipéptido o fragmento del mismo. En algunos aspectos, la construcción de ADN puede linealizarse antes de realizar una reacción de transcripción *in vitro*. Después, del ARNm transcrito se incuba con un extracto de traducción acelular apropiado, tal como un extracto de reticulocitos de conejo, para producir el polipéptido deseado o fragmento del mismo.

Los vector de expresión pueden contener uno o más genes marcadores de selección para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de células hospedadoras transformadas tal como dihidrofolato reductasa o resistencia a neomicina para cultivo de células eucariotas, o tales como resistencia a tetraciclina o ampicilina en *E. coli*.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden expresarse, o sobreexpresarse, en cualquier sistema de expresión *in vitro* o *in vivo*. Puede emplearse cualquier sistema de cultivo celular para expresar, o sobreexpresar, proteínas recombinantes, incluyendo cultivos de bacterias, insectos, levaduras, fúngicos o de mamíferos. La sobreexpresión puede efectuarse por elección apropiada de promotores, potenciadores, vectores (por ejemplo, el uso de vectores de replicón), vectores dicistrónicos (véase, por ejemplo, Gurtu (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229: 295-8)), medios, sistemas de cultivo y similar. En un aspecto, para sobreexpresar los polipéptidos de la invención se usa la amplificación génica usando marcadores de selección, por ejemplo, glutamina sintetasa (véase, por ejemplo, Sanders (1987) *Dev. Biol. Stand.* 66: 55-63), en sistemas de células.

Pueden emplearse diversos sistemas de cultivo de células de mamífero para expresar las proteínas recombinantes, los ejemplos de sistemas de expresión de mamíferos incluyen las líneas COS-7 de fibroblastos de riñón de mono, descritas en "SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants" (Gluzman, 1981), y otras líneas celulares capaces de expresar un vector compatible, por ejemplo, las líneas celulares C127, 3T3, CHO, HeLa y BHK. Los vectores de expresión de mamíferos comprenderán un origen de replicación, un promotor y un potenciador adecuados y también cualquiera de los sitios de unión a ribosoma necesarios, un sitio de poliadenilación, sitios donantes y aceptores de corte y empalme, secuencias de la terminación transcripcional, y secuencias flanqueantes no transcritas en posición 5'. Secuencias de ADN derivadas de los sitios de corte y empalme y de poliadenilación del SV40 para proporcionar los elementos genéticos no transcritos necesarios.

Las células hospedadoras que contienen los polinucleótidos de interés pueden cultivarse en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para la activación de promotores, selección de transformantes o amplificación de genes. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las previamente usadas con la célula hospedadora seleccionada para la expresión, y serán obvias para el experto habitual en la técnica. Los clones que se identifican como que tienen la actividad enzimática específica pueden después secuenciarse para identificar la secuencia polinucleotídica que codifica una enzima que tiene la actividad potenciada.

60 *Amplificación de ácidos nucleicos*

En la práctica de la invención, los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de la invención, o ácidos nucleicos modificados, pueden reproducirse, por ejemplo, por amplificación. Los pares de secuencias cebadoras de amplificación para amplificar ácidos nucleicos que codifican polipéptidos con una actividad fitasa, o secuencias de los mismos, pueden amplificar secuencias de ácidos nucleicos incluyendo la SEC ID N°: 1 ejemplar y al menos una de las modificaciones de secuencia específicas expuestas anteriormente. Un experto en la técnica puede diseñar

pares de secuencias cebadoras de amplificación para cualquier parte de o para la longitud completa de estas secuencias; por ejemplo:

- 5 La SEC ID N°: 1 "parental" es como se muestra anteriormente. Por tanto, un par de secuencias cebadoras de amplificación para amplificar esta secuencia parental, o una de las secuencias ejemplares de la invención que tiene al menos una de las modificaciones de secuencias específicas expuestas en el presente documento, pueden ser los restos 1 a 21 de la SEC ID N°: 1 (es decir, ATGAAAGCGATCTTAATCCCA) y la cadena complementaria de los 21 últimos restos de la SEC ID N°: 1 (es decir, la cadena complementaria de TGCAGTTTGAGATCTCATCTA).
- 10 También pueden usarse reacciones de amplificación para cuantificar la cantidad de ácido nucleico en una muestra (tal como la cantidad de mensaje en una muestra celular), marcar el ácido nucleico (por ejemplo, para aplicarlo a una matriz o a una transferencia), para detectar el ácido nucleico, o para cuantificar la cantidad de un ácido nucleico específico en una muestra. El mensaje aislado de una célula o una biblioteca de ADNc puede ser amplificado. El experto puede seleccionar y diseñar cebadores de amplificación oligonucleotídicos adecuados. Los métodos de amplificación son bien conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa, PCR (véanse, por ejemplo, PCR PROTOCOLS, A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS, ed. Innis, Academic Press, N.Y. (1990) y PCR STRATEGIES (1995), ed. Innis, Academic Press, Inc., N.Y., reacción en cadena de la ligasa (LCR) (véanse, por ejemplo, Wu (1989) Genomics 4: 560; Landegren (1988) Science 241: 1077; Barringer (1990) Gene 89: 117); amplificación de transcripción (véase, por ejemplo, Kwoh (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 86: 1173); y replicación de secuencia autosostenida (véase por ejemplo, Guatelli (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 87: 1874); amplificación mediante Q Beta replicasa (véase, por ejemplo, Smith (1997) J. Clin. Microbiol. 35: 1477-1491), ensayo de amplificación de Q-beta replicasa automatizado (véase, por ejemplo Burg (1996) Mol. Cell. Probes 10: 257-271) y otras técnicas mediadas por ARN polimerasa (por ejemplo, NASBA, Cangene, Mississauga, Ontario); véanse también Berger (1987) Methods Enzymol. 152: 307-316; Sambrook; Ausubel; Patentes de Estados Unidos N° 4.683.195 y 4.683.202; Sooknanan (1995) Biotechnology 13: 563-564.

Determinación del grado de identidad de secuencia

30 La invención proporciona un ácido nucleico aislado, sintético o recombinante, que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más con la SEC ID N°: 1, y que incluye las modificaciones de la SEC ID N°:1, enumeradas específicamente, indicadas anteriormente. El grado de identidad de secuencia (homología) puede determinarse usando cualquier programa informático y parámetros asociados, incluyendo los descritos en el presente documento, tales como BLAST 2.2.2. o FASTA versión 3.0t78, con los parámetros por defecto.

35 Las secuencias homologas también incluyen secuencias de ARN en las cuales las uridinas sustituyen a las timidinas en las secuencias de ácidos nucleicos. Las secuencias homólogas pueden obtenerse usando cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, o pueden ser el resultado de la corrección de un error de secuenciación. En este aspecto de la invención se usan diversos programas de comparación de secuencias identificados en el presente documento. Las identidades de las secuencias de proteínas y/o de aminoácidos (homologías) pueden evaluarse usando cualquiera de una diversidad de algoritmos y programas de comparación de secuencias conocidos en la técnica. Dichos algoritmos y programas incluyen, pero sin limitación, TBLASTN, BLASTP, FASTA, TFASTA y CLUSTALW (Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 85(8): 2444-2448, 1988; Altschul et al., J. Mol. Biol. 215(3): 403-410, 1990; Thompson et al., Nucleic Acids Res. 22(2): 4673-4680, 1994; Higgins et al., Methods Enzymol. 266: 383-402, 1996; Altschul et al., J. Mol. Biol. 215(3): 403-410, 1990; Altschul et al., Nature Genetics 3: 266-272, 1993.

50 La homología o identidad puede medirse usando el software de análisis de secuencias (por ejemplo el Paquete Informático de Análisis de Secuencia de Genética Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705). Dicho software empareja secuencias similares asignando grados de homología a diversas supresiones, sustituciones y otras modificaciones. Los términos "homología" e "identidad" en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o de polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son las mismas o que tienen un porcentaje específico de restos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales cuando se comparan o se alinean en busca de la máxima correspondencia a lo largo de una ventana de comparación o región designada según se mide usando cualquier número de algoritmos de comparación de secuencia o mediante alineamiento anual e inspección visual. Para la comparación de las secuencias, una secuencia puede actuar como una secuencia de referencia (una secuencia ejemplar de la invención) con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, las coordenadas de subsecuencias se designan, si fuera necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencias. Pueden usarse los parámetros por defecto del programa, o pueden diseñarse parámetros alternativos. Después, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidades de secuencia para las secuencias de ensayo con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

65 Una "ventana de comparación", como se usa en el presente documento, incluye la referencia a un segmento de uno cualquiera del número de restos contiguos. Por ejemplo, en aspectos alternativos de la invención, restos contiguos

que varían entre cualquiera de 20 con respecto a la longitud completa de una secuencia ejemplar de la invención, se comparan con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias estén óptimamente alineadas. Si la secuencia de referencia tiene la identidad de secuencia requerida con una secuencia ejemplar de la invención, por ejemplo, una identidad de secuencia de 98 % con la SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, y tiene una de las modificaciones de secuencia específicas indicadas anteriormente, esta secuencia está dentro del ámbito de la invención. En realizaciones alternativas, subsecuencias que varían de aproximadamente 20 a 600, de aproximadamente 50 a 200 y de aproximadamente 100 a 150 se comparan con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias están óptimamente alineadas. En la técnica se conocen bien métodos de alineamiento de secuencias para la comparación.

El alineamiento óptimo de secuencias para la comparación puede realizarse, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482, 1981, mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443, 1970, mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 85: 2444, 1988, mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Paquete Informático Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineamiento manual e inspección visual. Otros algoritmos para determinar homología o identidad incluyen, por ejemplo, además de un programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool en el National Center for Biological Information, tales como BLAST, BLAST2, BLASTN y BLASTX), ALIGN, AMAS (Analysis of Multiply Aligned Sequences), AMPS (Protein Multiple Sequence Alignment), ASSET (Aligned Segment Statistical Evaluation Tool), BANDS, BESTSCOR, BIOSCAN (Biological Sequence Comparative Analysis Node), BLIMPS (BLocks IMProved Searcher), FASTA, Intervals & Points, BMB, CLUSTAL V, CLUSTAL W, CONSENSUS, LCONSENSUS, WCONSENSUS, el algoritmo de Smith-Waterman, DARWIN, algoritmo de Las Vegas, FASTA (Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos*, 85: 2444, 1988), FASTDB (Brutlag et al. *Comp. App. Biosci.* 6: 237-245, 1990), FNAT (Forced Nucleotide Alignment Tool), Framealign, Framesearch, DYNAMIC, FILTER, FSAP (Fristensky Sequence Analysis Package), GAP (Global Alignment Program), GENAL, GIBBS, GenQuest, ISSC (Sensitive Sequence Comparison), LALIGN (Local Sequence Alignment), LCP (Local Content Program), MACAW (Multiple Alignment Construction & Analysis Workbench), MAP (Multiple Alignment Program), MBLKP, MBLKN, PIMA (Pattern-Induced Multisequence Alignment), SAGA (Sequence Alignment by Genetic Algorithm) y WHAT-IF. Otros programas y bases de datos usados para practicar la invención incluyen, pero sin limitación: MacPattem (EMBL), DiscoveryBase (Molecular Applications Group), GeneMine (Molecular Applications Group), Look (Molecular Applications Group), MacLook (Molecular Applications Group), Catalyst (Molecular Simulations Inc.), Catalyst/SHAPE (Molecular Simulations Inc.), Cerius2.DBAccess (Molecular Simulations Inc.), HypoGen (Molecular Simulations Inc.), Insight II, (Molecular Simulations Inc.), Discover (Molecular Simulations Inc.), CHARMM (Molecular Simulations Inc.), Felix (Molecular Simulations Inc.), DelPhi, (Molecular Simulations Inc.), QuanteMM, (Molecular Simulations Inc.), Homology (Molecular Simulations Inc.), Modeler (Molecular Simulations Inc.), ISIS (Molecular Simulations Inc.), Quanta/Protein Design (Molecular Simulations Inc.), WebLab (Molecular Simulations Inc.), WebLab Diversity Explorer (Molecular Simulations Inc.), Gene Explorer (Molecular Simulations Inc.), SeqFold (Molecular Simulations Inc.), la base de datos Chemicals Directory disponible en MDL, la base de datos MDL Drug Data Report, la base de datos de Comprehensive Medicinal Chemistry, la base de datos Derwent's World Drug, la base de datos BioByteMasterFile database, la base de datos Genbank y la base de datos GenSeq y la base de datos GenomeQuest. Muchos otros programas y bases de datos serán obvios para un experto en la técnica dada la presente descripción. Dichos programas de alineamiento pueden también usarse para explorar bases de datos genómicas para identificar secuencias de polinucleótidos que tienen secuencias sustancialmente idénticas. Existe un gran número de bases de datos genómicas, por ejemplo, a través del sitio web de NCBI (National Center for Biotechnology Information). Las bases de datos que contienen información genómica anotadas con cierta información funcional están mantenidas por diversas organizaciones y son accesibles vía internet.

Los algoritmos BLAST, BLAST 2.0 y BLAST 2.2.2 también se usan para la práctica de la presente invención. Estos algoritmos se describen, por ejemplo, en Altschul (1977) *Nuc. Acids Res.* 25: 3389-3402; Altschul (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410. El software para realizar los análisis BLAST se encuentra disponible al público a través del National Center for Biotechnology Information. Este algoritmo implica identificar en primer lugar pares de secuencias de alta puntuación (HSP, *High Scoring Sequence*) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de búsqueda, que coinciden o satisfacen determinada puntuación umbral T de valor positivo cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se define como el umbral de puntuación de palabra vecina (Altschul (1990) citado anteriormente). Estos resultados de palabra vecina iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar los HSP más largos que los contienen. Los resultados de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tanto como pueda incrementarse la puntuación de alineamiento acumulativa. Las puntuaciones acumulativas se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de restos coincidentes; siempre >0). Para secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de los resultados de palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulativo cae en la cantidad X desde su valor máximo logrado; la puntuación acumulativa va hasta cero o por debajo, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de restos de puntuación negativa; o se alcanza el extremo de cada secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST, W , T y X , determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa como defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, $M=5$, $N=-4$ y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza

como defecto una longitud de palabra de 3, y expectativas (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 89: 10915) alineamientos (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N= -4, y una comparación de ambas cadenas. El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 90: 5873). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de la suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad mediante la cual se produciría por casualidad un emparejamiento entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de ensayo con el ácido nucleico de referencia es menor que aproximadamente 0,2, menor que aproximadamente 0,01, o menor que aproximadamente 0,001. En un aspecto, las homologías de secuencia de proteínas y de ácidos nucleicos se evalúan usando la Herramienta de Búsqueda de Alineamiento Local Básica ("BLAST"). Por ejemplo, pueden usarse cinco programas BLAST específicos para realizar la siguiente tarea: (1) BLASTP y BLAST3 comparan una secuencia de búsqueda de aminoácidos frente a una base de datos de secuencias de proteínas; (2) BLASTN compara una secuencia de búsqueda de nucleótidos frente a una base de datos de secuencias de nucleótidos; (3) BLASTX compara los productos de traducción conceptual de seis marcos de una secuencia de nucleótidos de búsqueda (ambas cadenas) frente a una base de datos de secuencias proteicas; (4) TBLASTN compara una secuencia proteica de búsqueda frente a una base de datos de secuencias de nucleótidos traducida en los seis marcos de lectura (ambas cadenas); y (5) TBLASTX compara las traducciones de 6 marcos de una secuencia de búsqueda de nucleótidos frente a la traducciones de 6 marcos de una base de datos de secuencias de nucleótidos. Los programas BLAST identifican secuencias homólogas identificando segmentos similares, que en el presente documento se denominan "pares de segmentos de puntuación elevada", entre una secuencia de búsqueda de aminoácidos o de ácidos nucleicos y una secuencia de ensayo que puede obtenerse a partir de una base de datos de secuencias proteicas o de ácidos nucleicos. Los pares de segmentos de puntuación elevada pueden identificarse (es decir alinearse) mediante una matriz de puntuación, muchas de las cuales son conocidas en la técnica. Una matriz de puntuación ejemplar usada es la matriz BLOSUM62 (Gonnet et al., Science 256: 1443-1445, 1992; Henikoff and Henikoff, Proteins 17: 49-61, 1993). Como alternativa, pueden usarse las matrices PAM o PAM250 (véase, por ejemplo Schwartz y Dayhoff, eds., 1978, Matrices forcing Distance Relationships: Atlas of Protein Sequence and Structure, Washington: National Biomedical Research Foundation).

Para determinar si un ácido nucleico tiene la identidad de secuencia requerida para que esté dentro del ámbito de la invención, pueden usarse los programas de NCBI BLAST 2.2.2, opciones por defecto frente a blastp. Existen aproximadamente 38 opciones de ajuste en el programa BLAST 2.2.2. Pueden usarse todos los valores por defecto, excepto para el ajuste de filtro por defecto (es decir, todos los parámetros se ajustan por defecto excepto el filtrado, que se ajusta a OFF); en su lugar, se usa un ajuste "-F F" que deshabilita el filtro. El uso del filtrado por defecto a menudo da como resultado violaciones Karlin-Altschul debido a la corta longitud de la secuencia.

Los valores por defecto incluyen:

"Filtro para baja complejidad: ON

- > Tamaño de palabra: 3
- > Matriz: Blosum62
- > Costes de salto: Existencia: 11

> Extensión: 1"

"Filtro para baja complejidad: ON

Otros ajustes por defecto son: filtro para baja complejidad OFF, tamaño de palabra de 3 para proteína, matriz BLOSUM62, penalización de existencia de salto de -11 y penalización de existencia de salto de -1.

Se puede utilizar un algoritmo de comparación de secuencias para comparar una secuencia de ácido nucleico o secuencia de aminoácidos de la invención con una secuencia de referencia. Por ejemplo, el algoritmo de comparación de secuencias puede comparar las secuencias de nucleótidos o secuencias de aminoácidos de la invención con la secuencia "parental" SEC ID No: 1 y/o SEC ID No: 2, o con secuencias de referencia para identificar homologías o motivos estructurales. Se puede realizar una comparación de las secuencias para determinar si la primera secuencia es igual que la segunda secuencia. Cabe destacar que este tipo de comparación no se limita a realizar una comparación exacta entre la secuencia nueva y la primera secuencia en la base de datos. Los expertos en la técnica conocen métodos bien conocidos para comparar dos secuencias de nucleótidos o de proteínas, incluso si no son idénticas. Por ejemplo, pueden introducirse saltos en una secuencia para elevar el nivel de homología entre las dos secuencias sometidas a ensayo. Los parámetros que controlan si se introducen saltos u otras características en una secuencia durante la comparación normalmente los introduce el usuario del algoritmo de comparación.

Una vez realizada una comparación de las dos secuencias, se determina si las dos secuencias son iguales. Por supuesto, el término "iguales" no está limitado a secuencias que son absolutamente idénticas. La comparación de

secuencias puede indicar un nivel de identidad de la secuencia entre las secuencias comparadas o identificar motivos estructurales, o puede identificar motivos estructurales en secuencias que se comparan con estos códigos de ácido nucleico y códigos polipeptídicos. El nivel de identidad de la secuencia se determina calculando la proporción de caracteres entre las secuencias que fueron las mismas con respecto al número total de secuencias en la primera secuencia. Por tanto, si cada carácter en una primera secuencia de 100 nucleótidos se alinea con cada carácter en una segunda secuencia, el nivel de identidad de la secuencia sería del 100 %.

Como alternativa, el algoritmo puede comparar una secuencia de referencia con una secuencia de la invención para determinar si las secuencias difieren en una o más posiciones. El resultado de la comparación puede indicar la longitud e identidad de nucleótidos o restos de aminoácidos insertados, suprimidos o sustituidos, con respecto a la secuencia de referencia o de la invención. En otros aspectos, el algoritmo se puede utilizar para identificar características en un ácido nucleico o polipéptido de la invención. Por ejemplo, la característica identificadora puede comprender un marco abierto de lectura (ORF), un "codón de iniciación" (por ejemplo, el codón "ATG"), una "caja TAATAA" o motivos tales como hélices alfa, láminas beta o motivos de polipéptidos funcionales tales como sitios enzimáticos activos, motivos de hélice-giro-hélice, cremalleras de leucina, sitios de glucosilación, sitios de ubiquitinación, hélices alfa, láminas beta, secuencias señal que codifican péptidos señal que dirigen la secreción de las proteínas codificadas, secuencias implicadas en la regulación de la transcripción tales como homeocajas, fragmentos ácidos, sitios enzimáticos activos, sitios de unión al sustrato y sitios de escisión enzimática, así como también otros motivos conocidos por los expertos en la técnica.

Inhibición de la expresión de una fitasa

La invención proporciona además ácidos nucleicos complementarios con (por ejemplo, secuencias antisentido) las secuencias de ácidos nucleicos de la invención, incluyendo los ácidos nucleicos que comprenden secuencias antisentido, ARNi, ribozimas. Las secuencias antisentido pueden inhibir el transporte, el corte y empalme o la transcripción de genes que codifican fitasas. La inhibición puede efectuarse mediante el direccionamiento de ADN genómico o ARN mensajero. La transcripción o función de ácido nucleico diana puede inhibirse, por ejemplo, por hibridación y/o escisión. Un conjunto de inhibidores particularmente útil proporcionado por la presente invención incluye oligonucleótidos que pueden unir genes fitasa o mensajeros, en cualquier caso impidiendo o inhibiendo la producción o función de la enzima fitasa. La asociación puede ser a través de hibridación específica de secuencias. Otra clase útil de inhibidores incluye oligonucleótidos que producen la inactivación o la escisión del mensajero de fitasa. El oligonucleótido puede tener actividad enzimática que produce dicha escisión, tal como ribozimas. El oligonucleótido puede modificarse químicamente o conjugarse con una enzima o composición capaz de escindir el ácido nucleico complementario. Puede explorarse un conjunto de muchos de estos oligonucleótidos diferentes para determinar aquellos con la actividad deseada.

Oligonucleótidos antisentido

Los oligonucleótidos antisentido pueden comprender las modificaciones de la nueva secuencia fitasa de la invención, y pueden unirse al mensajero de fitasa que puede inhibir la actividad fitasa dirigiendo el ARNm. En la bibliografía científica y de patentes se describen bien estrategias para diseñar oligonucleótidos antisentido y el experto en la técnica puede diseñar dichos oligonucleótidos con actividad fitasa usando los nuevos reactivos de la invención. Por ejemplo, en la técnica se conocen bien protocolos de mapeo de paso de genes/ARN para explorar oligonucleótidos antisentido eficaces, véase, por ejemplo, Ho (2000) *Methods Enzymol.* 314: 168-183, que describen un ensayo de mapeo de ARN, que se basa en técnicas moleculares convencionales para proporcionar un método fácil y fiable para una fuerte selección de secuencias antisentido. Véase también Smith (2000) *Euro. J. Pharm. Sci.* 11: 191-198.

Como oligonucleótidos antisentido se usan ácidos nucleicos de origen natural. Los oligonucleótidos antisentido pueden tener cualquier longitud; por ejemplo, en aspectos alternativos, los oligonucleótidos antisentido pueden tener una longitud de aproximadamente 5 a 100, de aproximadamente 10 a 80, de aproximadamente 15 a 60, de aproximadamente 18 a 40. La longitud óptima puede determinarse por exploración rutinaria. Los oligonucleótidos antisentido pueden estar presentes a cualquier concentración. La concentración óptima puede determinarse por exploración rutinaria. Se conoce una amplia diversidad de análogos de ácido nucleico y nucleótidos de origen no natural que pueden abordar este problema potencial. Por ejemplo, pueden usarse ácidos nucleicos peptídicos (PNA, *Peptide Nucleic Acids*) que contienen estructuras no iónicas, tal como, unidades de N-(2-aminoetil) glicina. Los oligonucleótidos antisentido con enlaces fosforotioato también pueden usarse, como se describe en los documentos WO 97/03211; WO 96/39154; Mata (1997) *Toxicol Appl Pharmacol* 144: 189-197; Antisense Therapeutics, ed. Agarwal (Humana Press, Totowa, N.J., 1996). Los oligonucleótidos antisentido que tienen análogos estructurales de ADN sintético proporcionados por la invención también pueden incluir ácidos nucleicos de fosforo-ditioato, metilfosfonato, fosforoamidato, fosfotriéster de alquilo, sulfamato, 3'-tioacetal, metileno(metilimino), 3'-N-carbamato y morfolino carbamato, como se ha descrito anteriormente.

Puede usarse metodología química combinatoria para crear una amplia diversidad de oligonucleótidos que puede explorar rápidamente oligonucleótidos específicos con afinidades de unión apropiadas y especificidades hacia cualquier diana, tal como las secuencias sentido y antisentido de la fitasa de la invención (véase, por ejemplo Gold

(1995) J. of Biol. Chem. 270: 13581-13584).

Ribozimas inhibidoras

5 Las ribozimas que comprenden las modificaciones de secuencia de la nueva fitasa de la invención, pueden unirse a mensajeros de fitasa que pueden inhibir la actividad de la enzimática fitasa por direccionamiento de ARNm. Las estrategias para diseñar ribozimas y seleccionar la secuencia antisentido específica de fitasa por direccionamiento se describen bien en la bibliografía científica y de patentes, y el experto en la técnica puede diseñar dichas ribozimas usando los nuevos reactivos de la invención. Las ribozimas actúan uniéndose a un ARN diana a través de la parte
10 de unión al ARN diana de una ribozima que se mantiene en estrecha proximidad con una parte enzimática del ARN que escinde el ARN diana. Por tanto, la ribozima reconoce y se une a un ARN diana mediante emparejamiento de bases complementarias, y una vez unida en el sitio correcto, actúa enzimáticamente para escindir e inactivar el ARN diana. De esta manera, si la escisión se produce en la secuencia codificante, la escisión de un ARN diana destruirá su capacidad para dirigir la síntesis de una proteína codificada. Después de que una ribozima se haya unido y haya
15 escindido a su ADN diana, típicamente se libera de ese ARN y por tanto puede unirse y escindir nuevas dianas repetidas veces.

En algunas circunstancias, la naturaleza enzimática de una ribozima puede ser ventajosa sobre otras tecnologías, tales como la tecnología antisentido (donde una molécula de ácido nucleico se une simplemente a una diana de
20 ácido nucleico para bloquear su transcripción, traducción o asociación con otra molécula) ya que la concentración efectiva de ribozima necesaria para efectuar un tratamiento terapéutico puede ser menor que la de un oligonucleótido antisentido. Esta posible ventaja refleja la capacidad de la ribozima para actuar enzimáticamente. Por tanto, una sola molécula de ribozima puede escindir muchas moléculas de ARN diana. Además, una ribozima es típicamente un inhibidor altamente específico, dependiendo la especificidad de inhibición no solo del mecanismo de
25 unión de emparejamiento de bases, sino también del mecanismo mediante el cual la molécula inhibe la expresión del ARN al cual se une. Esto es, la inhibición se produce por escisión del ARN diana y por tanto la especificidad se define como la proporción de la velocidad de escisión del ARN diana sobre la velocidad de escisión del ARN no diana. Este mecanismo de escisión depende de factores adicionales a los implicados en el emparejamiento de bases. Por tanto, la especificidad de acción de una ribozima puede ser mayor que la de un oligonucleótido
30 antisentido que se une al mismo sitio de ARN. La molécula de ARN de ribozima enzimática puede formarse en un motivo de cabeza de martillo, pero también puede formarse en el motivo de una horquilla, de un virus delta de la hepatitis, de un intrón del grupo I o un ARN de tipo RNasaP (en asociación con una secuencia guía de ARN). Son ejemplos de dichos motivos de cabeza de martillo los descritos por Rossi (1992) Aids Research and Human Retroviruses 8: 183; motivos en horquilla por Hampel (1989) Biochemistry 28: 4929, y Hampel (1990) Nuc. Acids
35 Res. 18: 299; el motivo de virus delta de la hepatitis por Perrotta (1992) Biochemistry 31: 16; el motivo RNasaP por Guerrier-Takada (1983) Cell 35: 849; y el intrón del grupo I por Cech Patente de Estados Unidos Nº 4.987.071. La relación de estos motivos específicos no pretende ser limitante; los expertos en la técnica reconocerán que una molécula de ARN enzimática de la presente invención tiene un sitio de unión a sustrato específico complementario con una o más de las regiones de ARN del gen diana, y tiene secuencias de nucleótidos dentro de o cerca del sitio
40 de unión al sustrato que confiere una actividad de escisión de ARN a la molécula.

ARN de interferencia (ARNi)

45 Las moléculas inhibidoras de ARN, unas moléculas denominadas "ARNi" pueden comprender una secuencia enzimática de la invención. La molécula de ARNi comprende una molécula de ARN bicatenario (ARNbc). La molécula de ARNi, por ejemplo, ARNip y/o ARNmi, puede inhibir la expresión del gen de la enzima fitasa. En un aspecto, la molécula de ARNi, por ejemplo ARNip y/o ARNmi tiene una longitud de aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más nucleótidos dúplex.

50 Sin pretender limitarse a ningún mecanismo particular de acción, el ARNi puede entrar en una célula y provocar la degradación de un ARN monocatenario (ARNmc) de secuencias similares o idénticas, incluidos los ARNm endógenos. Cuando una célula se expone a ARN bicatenario (ARNbc), el ARNm del gen homólogo se degrada selectivamente mediante un proceso denominado ARN de interferencia (ARNi). Un posible mecanismo básico detrás del ARNi es la rotura de un ARN bicatenario (ARNbc) coincidente con una secuencia génica específica en pequeñas
55 piezas denominadas ARN de interferencia corto, que desencadenan la degradación de ARNm que corresponde a su secuencia. En un aspecto, los ARNi de la invención se usan en terapias de silenciamiento génico, véase, por ejemplo, Shuey (2002) Drug Discov. Today 7: 1040-1046. Los métodos para degradar selectivamente ARN usan estas moléculas de ARNi, por ejemplo ARNip y/o ARNmi. El ARN micro-inhibidor (ARNmi) inhibe la traducción, y el ARNip inhibe la transcripción. El proceso puede llevarse a la práctica *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Las moléculas de
60 ARNi pueden usarse para generar una mutación de pérdida de función en una célula, un órgano o un animal. En la técnica se conocen bien métodos para preparar y usar moléculas de ARNi, por ejemplo, ARNip y/o ARNmi, para degradar selectivamente ARN, véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nº 6.506.559; 6.511.824; 6.515.109; 6.489.127.

65 Modificación de ácidos nucleicos

Los métodos de generación de variantes de ácidos nucleicos de la invención pueden repetirse o usarse en diversas combinaciones para generar enzimas fitasas que tengan una actividad alterada o diferente o una estabilidad alterada o diferente de la de una fitasa codificada por el ácido nucleico molde. Estos métodos también pueden repetirse o usarse en diversas combinaciones, por ejemplo, para generar variaciones en la expresión génica/mensaje, traducción del mensaje o estabilidad del mensaje. La composición genética de una célula puede ser alterada, por ejemplo, por modificación de un gen homólogo *ex vivo*, seguido por su re inserción en la célula.

Los métodos para cambiar las características de una fitasa de la invención pueden ser por mutagénesis y otro método, incluyendo evolución dirigida, por ejemplo, estrategias patentadas por Diversa Corporation (San Diego, CA); por ejemplo, DirectEvolution; (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.830.696; Mutagénesis por Saturación de Sitio Génico (GSSM) (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos 6.171.820 y 6.579.258), Ensamblaje Génico Mediado por Exonucleasas en Evolución Dirigida (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 6.361.974 y 6.352.842), Selección Final en Evolución Dirigida (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos 6.358.709 y 6.238.884), Redistribución de Síntesis Basada en Recombinación (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos 5.965.408 y 6.440.668 y la Patente australiana N° AU724521) y Evolución Dirigida de Enzimas Termófilas (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos 5.830.696 y 6.335.179).

Las características de una fitasa pueden modificarse mediante un protocolo DirectEvolution que comprende: a) someter uno o más moldes moleculares, por ejemplo, los ácidos nucleicos fitasa de la invención, a mutagénesis para generar nuevas moléculas y b) seleccionar entre estas especies progenie de nuevas moléculas con más características deseables. El poder de la evolución dirigida depende de la elección de partida de los moldes de partida (por ejemplo, la SEC ID N°: 1 "parental", o cualquier secuencia de la presente invención), así como del proceso (o procesos) de mutagénesis seleccionado y del proceso (o procesos) de exploración utilizado. Por tanto, la invención proporciona nuevas fuentes, muy activas, fisiológicamente eficaces y económicas, de actividad fitasa, que incluye nuevas fitasas que: a) tienen actividades superiores bajo una o más aplicaciones específicas, tal como elaboración de productos alimenticios a altas temperaturas, y son por tanto útiles para optimizar estas aplicaciones específicas; b) son útiles como moldes para evolución dirigida para conseguir moléculas nuevas incluso adicionalmente mejoradas; y c) son útiles como herramientas para la identificación de moléculas adicionales relacionadas por medios tales como estrategias basadas en hibridación.

Un ácido nucleico de la invención puede modificarse mediante cualquier medio. Por ejemplo, métodos al azar o estocásticos, o, métodos no estocásticos o de "evolución dirigida". Los métodos para la mutación de genes al azar son bien conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.830.696. Por ejemplo, pueden usarse mutágenos para mutar aleatoriamente un gen. Los mutágenos incluyen, por ejemplo, luz ultravioleta o radiación gamma, o un mutágeno químico, por ejemplo mitomicina, ácido nitroso, psoralenos fotoactivados, en solitario o combinación, para inducir roturas de ADN susceptibles a subsanar por recombinación. Otros mutágenos químicos incluyen, por ejemplo, bisulfito sódico, ácido nitroso, hidroxilamina, hidracina o ácido fórmico. Otros mutágenos son análogos de precursores nucleotídicos, por ejemplo nitrosoguanidina, 5-bromouracilo, 2-aminopurina o acridina. Estos agentes pueden añadirse a una reacción PCR en lugar del precursor nucleotídico, mutando de esta manera la secuencia. También pueden usarse agentes intercalantes, tales como proflavina, acriflavina, quinacrina y similar.

Puede usarse cualquier técnica en biología molecular, por ejemplo, mutagénesis de PCR al azar, véase, por ejemplo Rice (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 89: 5467-5471; o, mutagénesis combinatoria de casete múltiple, véase, por ejemplo, Cramer (1995) Biotechniques 18: 194-196. Como alternativa, los ácidos nucleicos, por ejemplo, genes, pueden reensamblarse después de fragmentación al azar, o "estocástica", véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos 6.291.242; 6.287.862; 6.287.861; 5.955.358; 5.830.721; 5.824.514; 5.811.238; 5.605.793. En aspectos alternativos, las modificaciones, adiciones o supresiones se introducen mediante PCR propensa a errores, transposición, mutagénesis dirigida por oligonucleótidos, PCR de ensamblaje, mutagénesis de PCR sexual, mutagénesis *in vivo*, mutagénesis de casete, mutagénesis de conjunto recursiva, mutagénesis de conjunto exponencial, mutagénesis específica del sitio, reensamblaje génico, mutagénesis por saturación de sitio génico (GSSM), reensamblaje por ligamiento sintético (SLR), recombinación, recombinación de secuencia recursiva, mutagénesis de ADN modificado con fosfotioato, mutagénesis de molde que contiene uracilo, mutagénesis de dúplex con saltos, mutagénesis de reparación puntual por emparejamiento erróneo, mutagénesis de cepa hospedadora deficiente en reparación, mutagénesis química, mutagénesis radiogénica, mutagénesis de supresión, mutagénesis de restricción-selección, mutagénesis de restricción-purificación, síntesis génica artificial, mutagénesis de conjunto, creación de multímeros de ácidos nucleicos quiméricos y/o una combinación de estos y otros métodos.

Las siguientes publicaciones describen una diversidad de procedimientos de recombinación recursiva y/o métodos que pueden incorporarse en los métodos de la invención: Stemmer (1999) "Molecular breeding of viruses for targeting and other clinical properties" Tumor Targeting 4: 1-4; Ness (1999) Nature Biotechnology 17: 893-896; Chang (1999) "Evolution of a cytokine using DNA family shuffling" Nature Biotechnology 17: 793-797; Minshull (1999) "Protein evolution by molecular breeding" Current Opinion in Chemical Biology 3: 284-290; Christians (1999) "Directed evolution of thymidine kinase for AZT phosphorylation using DNA family shuffling" Nature Biotechnology 17: 259-264; Cramer (1998) "DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution"

Nature 391: 288-291; Cramer (1997) "Molecular evolution of an arsenate detoxification pathway by DNA shuffling," Nature Biotechnology 15: 436-438; Zhang (1997) "Directed evolution of an effective fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening" Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 94: 4504-4509; Patten et al. (1997) "Applications of DNA Shuffling to Pharmaceuticals and Vaccines" Current Opinion in Biotechnology 8: 724-733; Cramer et al. (1996) "Construction and evolution of antibody-phage libraries by DNA shuffling" Nature Medicine 2: 100-103; Cramer et al. (1996) "Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling" Nature Biotechnology 14: 315-319; Gates et al. (1996) "Affinity selective isolation of ligands from peptide libraries through display on a lac repressor 'headpiece dimer'" Journal of Molecular Biology 255: 373-386; Stemmer (1996) "Sexual PCR and Assembly PCR" In: The Encyclopedia of Molecular Biology. VCH Publishers, Nueva York. págs. 447-457; Cramer y Stemmer (1995) "Combinatorial multiple cassette mutagenesis creates all the permutations of mutant and wildtype cassettes" BioTechniques 18: 194-195; Stemmer et al. (1995) "Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides" Gene, 164: 49-53; Stemmer (1995) "The Evolution of Molecular Computation" Science 270: 1510; Stemmer (1995) "Searching Sequence Space" Bio/Technology 13: 549-553; Stemmer (1994) "Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling" Nature 370: 389-391; y Stemmer (1994) "DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution." Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 91: 10747-10751.

Los métodos mutacionales para generar diversidad incluyen, por ejemplo, mutagénesis dirigida (Ling et al. (1997) "Approaches to DNA mutagenesis: an overview" Anal Biochem. 254(2): 157-178; Dale et al. (1996) "Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the phosphorothioate method" Methods Mol. Biol. 57: 369-374; Smith (1985) "In vitro mutagenesis" Ann. Rev. Genet. 19: 423-462; Botstein y Shortle (1985) "Strategies and applications of in vitro mutagenesis" Science 229: 1193-1201; Carter (1986) "Site-directed mutagenesis" Biochem. J. 237:1-7; y Kunkel (1987) "The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis" in Nucleic Acids & Molecular Biology (Eckstein, F. y Lilley, D. M. J. eds., Springer Verlag, Berlín)); mutagénesis usando moldes que contienen uracilo (Kunkel (1985) "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection" Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 82: 488-492; Kunkel et al. "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection" Methods in Enzymol. 154, 367-382; y Bass et al. (1988) "Mutant Trp repressors with new DNA-binding specificities" Science 242: 240-245); mutagénesis dirigida por oligonucleótidos (Methods in Enzymol. 100: 468-500 (1983); Methods in Enzymol. 154: 329-350 (1987); Zoller y Smith (1982) "Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any DNA fragment" Nucleic Acids Res. 10: 6487-6500; Zoller y Smith (1983) "Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors" Methods in Enzymol. 100: 468-500; y Zoller y Smith (1987) "Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template" Methods in Enzymol. 154: 329-350); mutagénesis de ADN modificada con fosforotioato (Taylor et al. (1985) "The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA" Nucl. Acids Res. 13: 8749-8764; Taylor et al. (1985) "The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA" Nucl. Acids Res. 13: 8765-8787 (1985); Nakamaye (1986) "Inhibition of restriction endonuclease Nci I cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis" Nucl. Acids Res. 14: 9679-9698; Sayers et al. (1988) "Y-T Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis" Nucl. Acids Res. 16: 791-802; y Sayers et al. (1988) "Strand specific cleavage of phosphorothioate-containing DNA by reaction with restriction endonucleases in the presence of ethidium bromide" Nucl. Acids Res. 16: 803-814); mutagénesis usando ADN dúplex con salto (Kramer et al. (1984) "The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction" Nucl. Acids Res. 12: 9441-9456; Kramer y Fritz (1987) Methods in Enzymol. "Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA" 154: 350-367; Kramer et al. (1988) "Improved enzymatic in vitro reactions in the gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed construction of mutations" Nucl. Acids Res. 16: 7207; y Fritz et al. (1988) "Oligonucleotide-directed construction of mutations: a gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions in vitro" Nucl. Acids Res. 16: 6987-6999).

Protocolos adicionales incluyen reparación puntual de emparejamiento erróneo (Kramer (1984) "Point Mismatch Repair" Cell 38: 879-887), mutagénesis usando cepas hospedadoras deficientes en reparación (Carter et al. (1985) "Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors" Nucl. Acids Res. 13: 4431-4443; y Carter (1987) "Improved oligonucleotide-directed mutagenesis using M13 vectors" Methods in Enzymol. 154: 382-403), mutagénesis de supresión (Eghtedarzadeh (1986) "Use of oligonucleotides to generate large deletions" Nucl. Acids Res. 14: 5115), selección por restricción y selección por restricción y purificación por restricción (Wells et al. (1986) "Importance of hydrogen-bond formation in stabilizing the transition state of subtilisin" Phil. Trans. R. Soc. Lond. A 317: 415-423), mutagénesis por síntesis génica total (Nambiar et al. (1984) "Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein" Science 223: 1299-1301; Sakamar y Khorana "Total synthesis and expression of a gene for the α -subunit of bovine rod outer segment guanine nucleotide-binding protein (transducin)" Nucl. Acids Res. 14: 6361-6372; Wells et al. (1985) "Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites" Gene 34: 315-323; y Grundstrom et al. (1985) "Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale 'shot-gun' gene synthesis" Nucl. Acids Res. 13: 3305-3316), reparación de rotura bicatenaria (Mandecki (1986); Arnold (1993) "Protein engineering for unusual environments" Current Opinion in Biotechnology 4: 450-455. "Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of Escherichia coli: a method for site-specific mutagenesis" Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 83: 7177-7181).

65 Detalles adicionales o protocolos alternativos de muchos de los métodos anteriores pueden encontrarse en Methods

in Enzymology Volumen 154, que también describe controles útiles para resolver problemas con diversos métodos de mutagénesis. Véanse también las Patentes de Estados Unidos N° 5.605.793 de Stemmer (25 febrero de 1997), "Methods for In Vitro Recombination;" la Patente de Estados Unidos N° 5.811.238 de Stemmer et al. (22 septiembre de 1998) "Methods for Generating Polynucleotides having Desired Characteristics by Iterative Selection and Recombination;" la Patente de Estados Unidos N° 5.830.721 de Stemmer et al. (3 de noviembre de 1998), "DNA Mutagenesis by Random Fragmentation and Reassembly;" la Patente de Estados Unidos N° 5.834.252 de Stemmer, et al. (10 de noviembre de 1998) "End-Complementary Polymerase Reaction;" la Patente de Estados Unidos N° 5.837.458 de Minshull, et al. (17 de noviembre de 1998), "Methods and Compositions for Cellular and Metabolic Engineering;" el documento WO 95/22625, Stemmer y Cramer, "Mutagenesis by Random Fragmentation and Reassembly;" el documento WO 96/33207 de Stemmer y Lipschutz "End Complementary Polymerase Chain Reaction;" el documento WO 97/20078 de Stemmer y Cramer "Methods for Generating Polynucleotides having Desired Characteristics by Iterative Selection and Recombination;" el documento WO 97/35966 de Minshull y Stemmer, "Methods and Compositions for Cellular and Metabolic Engineering;" el documento WO 99/41402 de Punnonen et al. "Targeting of Genetic Vaccine Vectors;" el documento WO 99/41383 de Punnonen et al. "Antigen Library Immunization;" el documento WO 99/41369 de Punnonen et al. "Genetic Vaccine Vector Engineering;" el documento WO 99/41368 de Punnonen et al. "Optimization of Immunomodulatory Properties of Genetic Vaccines;" el documento EP 752008 de Stemmer y Cramer, "DNA Mutagenesis by Random Fragmentation and Reassembly;" el documento EP 0932670 de Stemmer "Evolving Cellular DNA Uptake by Recursive Sequence Recombination;" el documento WO 99/23107 de Stemmer et al., "Modification of Virus Tropism and Host Range by Viral Genome Shuffling;" el documento WO 99/21979 de Apt et al., "Human Papillomavirus Vectors;" el documento WO 98/31837 de del Cardayre et al. "Evolution of Whole Cells and Organisms by Recursive Sequence Recombination;" el documento WO 98/27230 de Patten y Stemmer, "Methods and Compositions for Polypeptide Engineering;" el documento WO 98/27230 de Stemmer et al., "Methods for Optimization of Gene Therapy by Recursive Sequence Shuffling and Selection;" el documento WO 00/00632, "Methods for Generating Highly Diverse Libraries;" el documento WO 00/09679, "Methods for Obtaining in Vitro Recombined Polynucleotide Sequence Banks and Resulting Sequences;" el documento WO 98/42832 de Arnold et al., "Recombination of Polynucleotide Sequences Using Random or Defined Primers;" el documento WO 99/29902 by Arnold et al., "Method for Creating Polynucleotide and Polypeptide Sequences;" el documento WO 98/41653 de Vind, "An in Vitro Method for Construction of a DNA Library;" el documento WO 98/41622 de Borchert et al., "Method for Constructing a Library Using DNA Shuffling;" y el documento WO 98/42727 de Pati y Zarling, "Sequence Alterations using Homologous Recombination."

Las solicitudes de Estados Unidos proporcionan detalles adicionales o protocolos alternativos con respecto a diversos métodos de generación de diversidad incluyendo "SHUFFLING OF CODON ALTERED GENES" de Patten et al. presentada el 28 de septiembre de 1999, (U.S. Ser. No. 09/407.800); "EVOLUTION OF WHOLE CELLS AND ORGANISMS BY RECURSIVE SEQUENCE RECOMBINATION" de del Cardayre et al., presentada el 15 de julio de 1998 (U.S. Ser. No. 09/166.188) y 15 de julio de 1999 (U.S. Ser. No. 09/354.922); "OLIGONUCLEOTIDE MEDIATED NUCLEIC ACID RECOMBINATION" de Cramer et al., presentada el 28 de septiembre de 28, 1999 (U.S. Ser. No. 09/408.392), y "OLIGONUCLEOTIDE MEDIATED NUCLEIC ACID RECOMBINATION" de Cramer et al., presentada el 18 de enero de 2000 (PCT/LTS00/01203); "USE OF CODON-VARIED OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS FOR SYNTHETIC SHUFFLING" de Welch et al., presentada el 28 de septiembre de 1999 (U.S. Ser. No. 09/408.393); "METHODS FOR MAKING CHARACTER STRINGS, POLYNUCLEOTIDES & POLYPEPTIDES HAVING DESIRED CHARACTERISTICS" de Selifonov et al., presentada el 18 de enero de 2000, (PCT/US00/01202) y, por ejemplo "METHODS FOR MAKING CHARACTER STRINGS, POLYNUCLEOTIDES & POLYPEPTIDES HAVING DESIRED CHARACTERISTICS" de Selifonov et al., presentada el 18 de julio de 2000 (U.S. Ser. No. 09/618.579); "METHODS OF POPULATING DATA STRUCTURES FOR USE IN EVOLUTIONARY SIMULATIONS" de Selifonov y Stemmer, presentada el 18 de enero de 2000 (PCT/US00/01138); y "SINGLE-STRANDED NUCLEIC ACID TEMPLATE-MEDIATED RECOMBINATION AND NUCLEIC ACID FRAGMENT ISOLATION" de Affholter, presentada el 6 de septiembre de 2000 (U.S. Ser. No. 09/656.549).

Los métodos no estocásticos, o de "evolución dirigida" que incluyen, por ejemplo, mutagénesis por saturación de sitio génico (GSSM), reensamblaje por ligamiento sintético (SLR), o una combinación de los mismos, se usan para modificar los ácidos nucleicos de la invención para generar fitasas con nuevas propiedades o con propiedades modificadas (por ejemplo, actividad en condiciones altamente ácidas o alcalinas, temperaturas altas o bajas y similares). La actividad de los polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos modificados puede explorarse antes de ensayar una fitasa u otra actividad. Puede usarse cualquier modalidad o protocolo de ensayo, por ejemplo, usando una plataforma de micromatriz capilar. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos 6.361.974; 6.280.926; 5.939.250.

60 *Mutagénesis por saturación, o GSSM*

Como se describen en el presente documento y también en las Patentes de Estados Unidos Nos 6.171.820 y 6.579.258, los métodos para preparar enzimas pueden usar mutagénesis por saturación de sitio génico o GSSM (*Gene Site Saturation Mutagenesis*).

65 En un aspecto, se usan cebadores de codón que contienen una secuencia N,N,G/T degenerada para introducir

mutaciones puntuales en un polinucleótido, por ejemplo, una enzima fitasa o un anticuerpo de la invención, para generar un conjunto de polipéptidos progenie en el que se representa una serie completa de sustituciones de aminoácidos sencillos en cada posición de aminoácido, por ejemplo, un resto de aminoácido en un sitio activo enzimático o en un sitio de unión a ligando dirigido para modificarse. Estos oligonucleótidos pueden comprender una
 5 primera secuencia homóloga contigua, una secuencia N,N,G/T degenerada y, opcionalmente, una segunda secuencia homóloga. Los productos traduccionales de la progenie aguas abajo a partir del uso de dichos oligonucleótidos incluyen todos los posibles cambios de aminoácidos en cada sitio de aminoácido a lo largo del polipéptido, debido a la degeneración de la secuencia N,N,G/T que incluye codones de los 20 aminoácidos. Un oligonucleótido degenerado de este tipo (que comprende, por ejemplo, un casete de N,N,G/T degenerado) puede
 10 usarse para someter cada codón original en un molde polinucleotídico parental a una serie completa de sustituciones de codón. Como alternativa, se usan al menos dos casetes degenerados- en el mismo oligonucleótido o no- para someter al menos dos codones originales en un molde polinucleotídico parental a una serie completa de sustituciones de codón. Por ejemplo, más de una secuencia N,N,G/T puede estar incluida en un oligonucleótido para introducir mutaciones de aminoácidos en más que un sitio. Esta pluralidad de secuencias N,N,G/T pueden ser
 15 directamente contigua, o estar separada mediante una o más secuencias de nucleótidos adicionales. Los oligonucleótidos que se utilizan para introducir adiciones y deleciones pueden usarse en solitario o en combinación con los codones que contienen una secuencia N,N,G/T, para introducir cualquier combinación o permutación de adiciones, deleciones y/o sustituciones de aminoácidos.

20 Puede realizarse mutagénesis simultánea de una o más posiciones de aminoácidos contiguos usando un oligonucleótido que contiene tripletes N,N,G/T contiguos, es decir, una secuencia (N,N,G/T)_n degenerada. Pueden usarse casetes degenerados que tienen menos degeneración que la secuencia N,N,G/T. Por ejemplo, en algunos casos puede ser deseable usar (por ejemplo, en un oligonucleótido) una secuencia triplete degenerada que comprenda solo un N, donde dicho N puede estar en la primera, segunda o tercera posición del triplete. Pueden
 25 usarse otras bases cualesquiera incluyendo cualquiera de sus combinaciones y permutaciones en las restantes dos posiciones del triplete. Como alternativa, en algunos casos puede ser deseable usar (por ejemplo, en un oligonucleótido) una secuencia triplete N,N,N degenerada.

El uso de tripletes degenerados (por ejemplo, tripletes N,N,G/T) permite la degeneración sistemática y sencilla de
 30 serie completa de aminoácidos naturales posibles (para un total de 20 aminoácidos) en cada una y todas las posiciones de aminoácidos en un polipéptido (en aspectos alternativos, los métodos también incluyen la generación de menos de todas las posibles sustituciones por resto de aminoácido o codón, posición). Por ejemplo, para un polipéptido de 100 aminoácidos, pueden generarse 2000 especies distintas (es decir 20 aminoácidos posibles por posición X 100 posiciones de aminoácidos). A través del uso de un oligonucleótido o conjunto de oligonucleótidos
 35 que contiene un triplete N,N,G/T degenerado, 32 secuencias individuales pueden codificar los 20 aminoácidos naturales posibles. Por tanto, en un recipiente de reacción en el que una secuencia polinucleotídica parental se somete a mutagénesis por saturación usando al menos uno de dichos oligonucleótidos, se generan 32 polinucleótidos progenie distintos que codifican 20 polipéptidos distintos. En cambio, el uso de un oligonucleótido no degenerado en mutagénesis dirigida conduce solo a un producto polipeptídico progenie por recipiente de reacción.
 40 Los oligonucleótidos no degenerados pueden usarse opcionalmente en combinación con cebadores degenerados descritos; por ejemplo, pueden usarse oligonucleótidos no degenerados para generar mutaciones puntuales específicas en un polinucleótido de trabajo. Esto proporciona un medio para generar mutaciones puntuales silenciosas específicas, mutaciones puntuales que conducen a cambios de aminoácidos correspondientes, y mutaciones puntuales que producen la generación de codones de terminación y la correspondiente expresión de
 45 fragmentos polipeptídicos.

Cada recipiente de reacción de mutagénesis por saturación puede contener polinucleótidos que codifican al menos
 50 20 moléculas (por ejemplo, enzimas fitasa) polipeptídicas progenie de tal manera que los 20 aminoácidos naturales se representan en una posición de aminoácido específica correspondiente a la posición de codón mutagenizado en el polinucleótido parental (otros aspectos usan menos de las 20 combinaciones naturales). Los polipéptidos progenie degenerados 32 veces generados a partir de cada recipiente de reacción de mutagénesis por saturación pueden someterse a amplificación clonal (por ejemplo clonarse en un hospedador adecuado, por ejemplo, un hospedador de *E. coli*, usando, por ejemplo, un vector de expresión) y someterse a exploración de la expresión. Cuando un polipéptido progenie individual se identifica por exploración para presentar un cambio favorable en particular (cuando se compara con el polipéptido parental, tal como actividad de hidrólisis de glucano aumentada en condiciones alcalinas o ácidas), este puede secuenciarse para identificar la sustitución de aminoácido correspondientemente favorable contenida en su interior.
 55

Después de la mutagenización de cada una y todas las posiciones de aminoácidos en un polipéptido parental usando mutagénesis por saturación como se describe en el presente documento, los cambios de aminoácidos favorables pueden identificarse en más de una posición de aminoácidos. Pueden generarse una o más moléculas progenie nuevas que contengan una combinación de toda o parte de estas sustituciones de aminoácidos favorables. Por ejemplo, si se identifican 2 cambios de aminoácidos favorables específicos en cada una de las 3 posiciones de aminoácidos en un polipéptido, las permutaciones incluyen 3 posibilidades en cada posición (sin cambios del
 65 aminoácido original y cada uno de dos cambios favorables) y 3 posiciones. Por tanto, hay 3 x 3 x 3 o 27 posibilidades totales, incluyendo 7 que se examinaron previamente - 6 mutaciones puntuales sencillas (es decir 2 en

cada una de tres posiciones) y ningún cambio en ninguna posición.

La mutagénesis por saturación puede usarse junto con transposición, quimerización, recombinación y otros procesos de mutagenización, junto con exploración. Esto proporciona el uso de cualquier proceso (o procesos) de mutagenización, incluyendo mutagénesis por saturación, de una manera iterativa. El uso iterativo de cualquier proceso (o procesos) de mutagenización puede usarse en combinación con exploración.

Los cebadores de codones exclusivos (que contienen una secuencia N,N,N degenerada) pueden usarse para introducir mutaciones puntuales en un polinucleótido, de manera que se genera un conjunto de polipéptidos progenie en el que se representa una serie completa de sustituciones de aminoácidos sencillos en cada posición de aminoácido (Mutagénesis por Saturación de Sitio Génico (GSSM)). Los oligos usados comprenden de manera contigua una primera secuencia homóloga, una secuencia N,N,N degenerada y en un aspecto, pero no necesariamente, una segunda secuencia homóloga. Los productos traduccionales progenie aguas abajo a partir del uso de dichos oligos incluyen todos los posibles cambios de aminoácidos en cada sitio de aminoácido a lo largo del polipéptido, debido a que la degeneración de la secuencia N,N,N incluye codones de los 20 aminoácidos.

Un oligo degenerado de este tipo (que comprende un casete N,N,N degenerado) puede usarse para someter cada codón original en un molde polinucleotídico parental a una serie completa de sustituciones de codones. Pueden usarse al menos dos casetes de N,N,N degenerados - en el mismo oligo o no, para someter al menos dos codones originales en un molde polinucleotídico parental a una serie completa de sustituciones de codones. Por tanto, más de una secuencia N,N,N puede estar incluida en un oligo para introducir mutaciones de aminoácidos en más de un sitio. Esta pluralidad de secuencias N,N,N puede ser directamente contigua, o estar separada por una o más secuencias de nucleótidos adicionales. Los oligonucleótidos que se utilizan para introducir adiciones y deleciones pueden usarse en solitario o en combinación con los codones que contienen una secuencia N,N,N, para introducir cualquier combinación o permutación de adiciones, deleciones y/o sustituciones de aminoácidos.

Es posible mutagenizar simultáneamente dos o más posiciones de aminoácidos contiguos usando un oligo que contenga tripletes N,N,N contiguos, es decir, una secuencia (N,N,N)_n degenerada.

Pueden usarse casetes degenerados que tienen menos degeneración que la secuencia N,N,N. Por ejemplo, en algunos casos puede ser deseable usar (por ejemplo, en un oligo) una secuencia triplete degenerada que comprende solo un N, donde el N puede ser la primera, segunda o tercera posición del triplete. Cualquier otra base, incluyendo cualquiera de sus combinaciones y permutaciones, puede usarse en las dos posiciones restantes del triplete. Como alternativa, en algunos casos puede ser deseable usar (por ejemplo, en un oligo) una secuencia triplete N,N,N degenerada, N,N,G/T, o una secuencia triplete N, N, G/C.

Sin embargo, como se desvela, se aprecia que el uso de un triplete degenerado (tal como una secuencia triplete N,N,G/T o una N,N,G/C) es ventajoso por varias razones. Esto proporciona un medio para generar sistemáticamente y de un modo bastante fácil la sustitución de la serie completa de aminoácidos posibles (para un total de 20 aminoácidos) en cada una y en todas las posiciones de aminoácidos de un polipéptido. Por tanto, para un polipéptido de 100 aminoácidos, esto proporciona una forma de generar sistemáticamente y de modo bastante fácil 2000 especies distintas (es decir 20 aminoácidos posibles por posición X 100 posiciones de aminoácidos). Se aprecia que, a través del uso de un oligo que contiene una secuencia triplete N,N,G/T o una N,N, G/C degenerada, se proporcionan 32 secuencias individuales que codifican 20 posibles aminoácidos. Por tanto, en un recipiente de reacción en el que una secuencia polinucleotídica parental se somete a mutagénesis por saturación usando dicho oligo, se generan 32 polinucleótidos progenie distintos que codifican 20 polipéptidos distintos. En cambio, el uso de un oligo no degenerado en mutagénesis dirigida conduce solo a un producto polipeptídico progenie por recipiente de reacción.

Pueden usarse oligos no degenerados opcionalmente que pueden ser usados en combinación con cebadores degenerados desvelados. Se aprecia que en algunas situaciones, es ventajoso el uso de oligos no degenerados para genera mutaciones puntuales específicas en un polinucleótido de trabajo. Esto proporciona un medio para generar mutaciones puntuales silenciosas específicas, mutaciones puntuales que conducen a cambios de aminoácidos correspondientes y a mutaciones puntuales que producen la generación de codones de terminación y la expresión correspondiente de fragmentos polipeptídicos.

Por tanto, cada recipiente de reacción de mutagénesis por saturación puede contener polinucleótidos que codifican al menos 20 moléculas de polipéptido progenie, de tal manera que los 20 aminoácidos se representan en una posición de aminoácido específica que corresponde a la posición de codón mutagenizado en el polinucleótido parental. Los polipéptidos progenie degenerados 32 veces generados a partir de cada recipiente de reacción de mutagénesis por saturación pueden someterse a amplificación clonal (por ejemplo, clonarse en un hospedador de *E. coli* adecuado usando un vector de expresión) y someterse a exploración de expresión. Cuando un polipéptido progenie individual se identifica por exploración para mostrar un cambio favorable en particular (cuando se compara con el polipéptido parental), este puede secuenciarse para identificar la sustitución de aminoácido correspondientemente favorable contenida en su interior.

Se aprecia que después de la mutagenización de cada una y todas las posiciones de aminoácidos en un polipéptido parental usando mutagénesis por saturación, como se describe en el presente documento, pueden identificarse cambios de aminoácidos favorables en más de una posición de aminoácido. Pueden generarse una o más moléculas progenie nuevas que contengan una combinación de todas o de parte de estas sustituciones de aminoácidos favorables. Por ejemplo, si se identifican 2 cambios de aminoácidos favorables específicos en cada una de las 3 posiciones de aminoácidos en un polipéptido, las permutaciones incluyen 3 posibilidades en cada posición (ningún cambio a partir del aminoácido original y cada uno de dos cambios favorables) y 3 posiciones. Por tanto, existen $3 \times 3 \times 3$ o 27 posibilidades totales, incluyendo 7 que se examinaron previamente - 6 mutaciones puntuales sencillas (es decir, 2 en cada una de las tres posiciones) y ningún cambio en ninguna posición.

Por tanto, esto proporciona el uso de la mutagénesis por saturación en combinación con procesos de mutagenización adicionales, tales como procesos en los que se introducen dos o más polinucleótidos relacionados en una célula hospedadora adecuada de tal manera que se genera un polinucleótido híbrido por recombinación y redistribución reductora.

Además para realizar la mutagénesis a lo largo de toda la secuencia de un gen, la mutagénesis puede usarse para reemplazar cada uno de cualquier número de bases en una secuencia polinucleotídica, donde el número de bases a mutagenizar es en un aspecto cualquier entero de 15 a 100.000. Por tanto, en lugar de mutagenizar cualquier posición a lo largo de una molécula, puede someterse a cualquiera o a un número específico de bases (en un aspecto un subconjunto que llega a ser de 15 a 100.000). Puede usarse un nucleótido distinto para mutagenizar cada posición o grupo de posiciones a lo largo de la secuencia polinucleotídica. Un grupo de 3 posiciones a mutagenizar puede ser un codón. Las mutaciones pueden introducirse usando un cebador mutagénico, que contenga un casete heterólogo, denominado también casete mutagénico. Los casetes ejemplares pueden tener de 1 a 500 bases. Cada posición de nucleótido en dichos casetes heterólogos es N, A, C, G, T, A/C, A/G, A/T, C/G, C/T, G/T, C/G/T, A/G/T, A/C/T, A/C/G, o E, donde E es cualquier base que no sea A, C, G o T (E puede referirse a un oligo diseñador).

En un sentido general la mutagénesis por saturación comprende un conjunto completo de casetes mutagénicos (donde cada casete tiene, en un aspecto, aproximadamente de 1-500 bases de longitud) en una secuencia polinucleotídica definida a mutagenizar (donde la secuencia a mutagenizar tiene, en un aspecto, aproximadamente de 15 a 100.000 bases de longitud). Por tanto, en cada casete a mutagenizar se introduce un grupo de mutaciones (que varía de 1 a 100 mutaciones). Una agrupación de mutaciones a introducir en un casete puede ser diferente o igual a la de una misma agrupación de mutaciones a introducir en un segundo casete durante la amplificación de una ronda de mutagénesis por saturación. Dichas agrupaciones se ilustran por deleciones, adiciones, agrupaciones de codones particulares y agrupaciones de casete de nucleótidos particulares.

Las secuencias definidas a mutagenizar incluyen un gen completo, una ruta, un ADNc, un fase de lectura abierta (ORF, *Open Reading Frame*) entera y un promotor entero, un potenciador, un represor/transactivador, un origen de replicación, un intrón, un operador, o cualquier grupo polinucleotídico funcional. Generalmente, una "secuencia definida" para este fin puede ser cualquier polinucleótido que tenga una secuencia polinucleotídica de 15 bases y secuencias polinucleotídicas de longitudes entre 15 bases y 15.000 bases (la presente invención designa cualquier número entero entre medias). Las consideraciones en la elección de agrupaciones de codones incluyen tipos de aminoácidos codificados por un casete mutagénico degenerado.

En una ilustración ejemplar puede introducirse una agrupación de mutaciones en un casete mutagénico, la presente invención proporciona específicamente sustituciones de codones degenerados (usando oligos degenerados) que codifican 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20 aminoácidos en cada posición y una biblioteca de polipéptidos codificada por estos.

50 *Reensamblaje por ligamiento sintético (SLR)*

Un sistema de modificación de genes no estocástico denominado "reensamblaje por ligamiento sintético" o simplemente "SLR" (*Synthetic Ligation Reassembly*) un "proceso de evolución dirigido", genera polipéptidos, por ejemplo, las enzimas fitasas o anticuerpos de la invención, con propiedades nuevas o modificadas. El SLR es un método de ligamiento no estocástico simultáneo de fragmentos oligonucleotídicos. Este modo difiere de la transposición estocástica de oligonucleótidos en que los bloques de construcción de ácido nucleico no se transponen, concatenan o quimerizan aleatoriamente, sino más bien se ensamblan de forma no estocástica. Véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 6.773.900; 6.740.506; 6.713.282; 6.635.449; 6.605.449; 6.537.776.

El SLR comprende las siguientes etapas: (a) proporcionar un polinucleótido molde, donde el polinucleótido molde comprende una secuencia que codifica un gen homólogo; (b) proporcionar una pluralidad de polinucleótidos de bloques de construcción, donde los polinucleótidos de bloques de construcción se diseñan para el reensamblaje cruzado con el polinucleótido molde en una secuencia predeterminada, y un polinucleótido de bloque de construcción comprende una secuencia que es una variante de gen homólogo y una secuencia homóloga al polinucleótido molde que flanquea la secuencia variante; (c) combinar un polinucleótido de bloque de construcción

con un polinucleótido molde de manera que el polinucleótido de bloque de construcción se reensambla de forma cruzada con el polinucleótido molde para generar polinucleótidos que comprenden variaciones de secuencias génicas homólogas.

5 El SLR no depende de la presencia de niveles elevados de homología entre los polinucleótidos a reordenar. Por tanto, este método puede usarse para generar no de forma no estocástica bibliotecas (o conjuntos) de moléculas progenie que comprenden aproximadamente 10^{100} quimeras diferentes. El SLR puede usarse para generar bibliotecas que comprenden aproximadamente 10^{1000} quimeras progenie diferentes. Unos aspectos incluyen los métodos no estocásticos para producir un conjunto de moléculas de ácido nucleico quiméricas finalizadas que tienen un orden de ensamblaje global que se selecciona mediante diseño. Este método incluye las etapas de generar mediante diseño una pluralidad de bloques de construcción de ácidos nucleicos específicos que tienen extremos compatibles que pueden ligarse mutuamente utilizables y ensamblar estos bloques de construcción de ácidos nucleicos, de manera que se logre un orden de ensamblaje global diseñado. Los extremos compatibles que pueden ligarse mutuamente de los bloques de construcción de ácidos nucleicos a ensamblar se consideran "utilizables" para este tipo de ensamblaje ordenado y permiten que los bloques de construcción puedan acoplarse en órdenes predeterminados. De este modo, el orden de ensamblaje global en el que pueden acoplarse los bloques de construcción de ácidos nucleicos se especifica mediante el diseño de los extremos que pueden ligarse. Si se usa más de una etapa de ensamblaje, entonces el orden de ensamblaje global en el que pueden acoplarse los bloques de construcción de ácidos nucleicos también se especifica mediante el orden secuencial de la etapa (o etapas) de ensamblaje. Los trozos de construcción hibridados pueden tratarse con una enzima, tal como una ligasa (por ejemplo ADN ligasa de T4), para conseguir un enlace covalente de los trozos de construcción. Un método no estocástico denominado reensamblaje por ligamiento sintético (SLR), que está algo relacionado con la transposición estocástica, salva a los bloques de construcción de ácido nucleico de no estar transpuestos o concatenados o quimerizados al azar, sino que están ensamblados de manera no estocástica por lo que pueden usarse para crear variantes.

El método SLR no depende de la presencia de un nivel elevado de homología entre los polinucleótidos a transponer. Esto puede usarse para generar de forma no estocástica bibliotecas (o conjuntos) de moléculas progenie que comprenden más de 10^{100} quimeras diferentes. De modo conveniente, el SLR puede incluso usarse para generar bibliotecas que comprenden más de 10^{1000} quimeras progenie diferentes.

Un método no estocástico para producir un conjunto de moléculas de ácido nucleico quiméricas finalizadas que tienen un orden de ensamblaje global que se selecciona por diseño, cuyo método comprende las etapas de generar por diseño una pluralidad de bloques de construcción de ácido nucleico específicos que tienen extremos compatibles que pueden ligarse mutuamente utilizables y ensamblar estos bloques de construcción de ácidos nucleicos, de tal manera que se consigue un orden de ensamblaje global diseñado.

Los extremos compatibles que pueden ligarse mutuamente de los bloques de construcción de ácidos nucleicos a ensamblar se consideran que son "utilizables" para este tipo de ensamblaje ordenado si permiten que los bloques de construcción se acoplen en órdenes predeterminados. Por tanto, el orden de ensamblaje global en el que los bloques de construcción de ácido nucleico pueden acoplarse es específico por el diseño de los extremos que pueden ligarse y, si se usa más de una etapa de ensamblaje, entonces el orden de ensamblaje global en el que los bloques de construcción de ácido nucleico pueden acoplarse es también específico por el orden secuencial de la etapa (o etapas) de ensamblaje. Los trozos de construcción hibridados pueden tratarse con una enzima, tal como una ligasa (por ejemplo, una ADN ligasa de T4) para conseguir la unión covalente de los trozos de construcción.

El diseño de los bloques de construcción de ácido nucleico puede obtenerse después del análisis de las secuencias de un conjunto de moldes de ácido nucleico progenitores que sirven como una base para la producción de un conjunto progenie de moléculas de ácido nucleico quiméricas finalizadas. Estos moldes de ácido nucleico progenitores sirven por tanto como una fuente de información de secuencia que ayuda en el diseño de los bloques de construcción de ácido nucleico que deben mutagenizarse, es decir quimerizarse o transponerse.

Esto proporciona la quimerización de una familia de genes relacionados y su familia codificada de productos relacionados, por ejemplo enzimas. Las enzimas y los polipéptidos para el uso pueden mutageneizarse de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento.

Por tanto, las secuencias de una pluralidad de moldes de ácido nucleico progenitor se alinean para seleccionar uno o más puntos de demarcación, cuyos puntos de demarcación pueden localizarse en un área de homología. Los puntos de demarcación pueden usarse para delinear los límites de los bloques de construcción de ácido nucleico a generar. Por tanto, los puntos de demarcación identificados y seleccionados en las moléculas progenitoras sirven como puntos de quimerización posibles en el ensamblaje de las moléculas progenie.

Típicamente, un punto de demarcación utilizable es un área de homología (que está comprendida al menos por una base de nucleótidos homóloga) compartida por al menos dos moldes progenitores, pero el punto de demarcación puede ser un área de homología que está compartida por al menos la mitad de los moldes progenitores, al menos dos tercios de los moldes progenitores, al menos tres cuartas partes de los moldes progenitores o casi todos los

moldes progenitores. Un punto de demarcación utilizable es un área de homología que está compartido por todos los moldes progenitores.

5 El proceso de reensamblaje por ligamiento puede realizarse de modo exhaustivo, para generar una biblioteca exhaustiva. En otras palabras, todas las posibles combinaciones ordenadas de los bloques de construcción de ácido nucleico se representan en el conjunto de moléculas de ácido nucleico quiméricas finalizadas. Al mismo tiempo, el orden de ensamblaje (es decir el orden de ensamblaje de cada bloque de construcción en la secuencia 5' a 3' de cada ácido nucleico quimérico finalizado) en cada combinación es por diseño (o no estocástico). Debido a la naturaleza no estocástica del método, se reduce enormemente la posibilidad de productos secundarios no deseados.

15 El proceso de reensamblaje por ligamiento, puede realizarse sistemáticamente, por ejemplo, para generar una biblioteca sistemáticamente compartimentalizada, con compartimentos que pueden explorarse sistemáticamente, por ejemplo, uno por uno. Esto proporciona que, a través del uso selectivo y juicioso de bloques de construcción de ácido nucleico específicos, junto con el uso selectivo y juicioso de reacciones de ensamblaje secuencialmente por etapas, puede conseguirse un diseño experimental donde se preparan conjuntos específicos de productos proge-
nie en cada uno de los diversos recipientes de reacción. Esto permite llevar a cabo un procedimiento de examen y selección sistemático. De este modo, se permite examinar sistemáticamente en grupos más pequeños un número potencialmente muy grande de moléculas proge-
nie.

20 Debido a su capacidad para realizar quimerizaciones de una manera que es muy flexible aunque igualmente exhaustiva y sistemática, particularmente cuando hay un bajo nivel de homología entre las moléculas progenitoras, la presente invención proporciona la generación de una biblioteca (o conjunto) comprendida de un gran número de moléculas proge-
nie. Debido a la naturaleza no estocástica del presente reensamblaje por ligamiento, las moléculas proge-
nie generadas pueden comprender una biblioteca de moléculas de ácido nucleico quiméricas finalizadas que tiene un orden de ensamblaje global que se elige por diseño. Tal biblioteca generada puede comprender más de 10^3 a más de 10^{1000} diferentes especies moleculares de proge-
nie.

30 Un conjunto de moléculas de ácido nucleico quiméricas finalizadas, producidas como se describe, está comprendido por un polinucleótido que codifica un polipéptido, que puede ser un gen, que puede ser un gen producido por el hombre. El polinucleótido puede ser una ruta génica, que puede ser una ruta genética fabricada por el hombre. Uno o más genes producidos por el hombre generados de este modo pueden incorporarse en una ruta génica fabricada por el hombre, tal como una ruta operativa en un organismo eucariota (incluyendo una planta).

35 La naturaleza sintética de la etapa en la que se generan los bloques de construcción permite el diseño e introducción de nucleótidos (por ejemplo, uno o más nucleótidos, que pueden ser, por ejemplo, codones o intrones o secuencias reguladoras) que posteriormente, opcionalmente pueden eliminarse en un proceso *in vitro* (por ejemplo por mutagénesis) o en un proceso *in vivo* (por ejemplo, utilizando la capacidad de corte y empalme génica de un organismo hospedador). Se aprecia que en muchos casos la introducción de estos nucleótidos también puede ser deseable por muchas otras razones además del beneficio posible de crear un punto de demarcación útil.

40 Por tanto, un bloque de construcción de ácido nucleico puede usarse para introducir un intrón. Pueden introducirse intrones funcionales en un gen producido por el hombre. Los intrones funcionales pueden introducirse en una ruta génica fabricada por el hombre. Un polinucleótido quimérico puede generarse que es un gene producido por el hombre que contiene uno o más intrones introducidos artificialmente.

50 Un polinucleótido quimérico que es una ruta génica fabricada por el hombre puede contener uno o más intrones artificialmente introducidos que pueden ser funcionales en una o más células hospedadoras para el corte y empalme génico gran parte en el modo en el que los intrones de origen natural sirven funcionalmente en el corte y empalme génico. Los polinucleótidos que contienen intrones producidos por el hombre pueden producirse para introducir en un organismo hospedador por recombinación y/o corte y empalme.

55 Un gen fabricado por el hombre producido de este modo también puede servir como un sustrato para la recombinación con otro ácido nucleico. Del mismo modo, una ruta génica fabricada por el hombre producida de este modo también puede servir como un sustrato para la recombinación con otro ácido nucleico. La recombinación puede facilitarse mediante, o se produce en, áreas de homología entre el gen que contiene intrones producidos por el hombre y un ácido nucleico que sirve como un compañero de recombinación. El compañero de recombinación también puede ser un ácido nucleico generado como descrito, incluyendo un gen producido por el hombre o una ruta génica fabricada por el hombre. La recombinación puede facilitarse por o puede ocurrir en áreas de homología que existen en uno (o más) intrón (intrones) introducido artificialmente en el gen producido por el hombre.

65 El método de reensamblaje por ligamiento sintético utiliza una pluralidad de bloques de construcción de ácido nucleico, cada uno de los cuales puede tener dos extremos que pueden ligarse. Los dos extremos que pueden ligarse de cada bloque de construcción de ácido nucleico pueden ser dos extremos romos (es decir, teniendo cada uno un saliente de cero nucleótidos) o un extremo romo y un saliente, o dos salientes.

Un saliente útil para este fin puede ser un saliente en posición 3' o un saliente en posición 5'. Por tanto, un bloque de construcción de ácido nucleico puede tener un saliente en posición 3' o, como alternativa, un saliente en posición 5' o, como alternativa, dos salientes en posición 3' o, como alternativa, dos salientes en posición 5'. El orden global en el que los bloques de construcción de ácido nucleico se ensamblan para formar una molécula de ácido nucleico quimérica finalizada se determina por diseño experimental determinado y no es aleatorio.

Un bloque de construcción de ácido nucleico puede generarse por síntesis química de dos ácidos nucleicos monocatenarios (denominados también oligos monocatenarios) y poniéndolos en contacto para permitir que se hibriden para formar un bloque de construcción de ácido nucleico bicatenario.

Un bloque de construcción de ácido nucleico bicatenario puede tener un tamaño variable. Estos bloques de construcción pueden ser de tamaño pequeño o grande. Los tamaños ejemplares de los bloques de construcción varían de un par de bases (sin incluir ningún saliente) a 100.000 pares de bases (sin incluir ninguno saliente). También se proporcionan otros intervalos de tamaño, que tienen límites inferiores de 1 pb a 10.000 pb (incluyendo entre ellos cualquier valor de número entero) y límites superiores de 2 pb a 100.000 pb (incluyendo entre ellos cualquier valor de número entero).

Existen muchos métodos mediante los cuales puede generarse un bloque de construcción de ácido nucleico bicatenario que puede ser útil; y son conocidos en la técnica y puede realizarlos fácilmente el experto en la técnica.

Un bloque de construcción de ácido nucleico bicatenario puede generarse generando primero dos ácidos nucleicos monocatenarios y permitiendo que se hibriden para formar un bloque de construcción de ácido nucleico bicatenario. Las dos cadenas de un bloque de construcción de ácido nucleico bicatenario pueden ser complementarias con cualquier nucleótido aparte de cualquiera que forme un saliente; no conteniendo por tanto desapareamientos, con la excepción de cualquier saliente (o salientes). O, las dos cadenas de un bloque de construcción de ácido nucleico bicatenario pueden ser complementarias al menos de cada nucleótido aparte de cualquiera que forme un saliente. Por tanto, para introducir degeneración de codones puede usarse un bloque de construcción de ácido nucleico bicatenario. La degeneración de codones puede introducirse usando la mutagénesis por saturación de sitio descrita en el presente documento, usando uno o más casetes N,N,G/T o, como alternativa, usando uno o más casetes N,N,N.

El método de recombinación *in vivo* puede realizarse a ciegas sobre un conjunto de híbridos o alelos desconocidos de un polinucleótido o secuencia específico(a). Sin embargo, no es necesario conocer la secuencia de ADN o ARN real del polinucleótido específico.

La estrategia de usar recombinación dentro de una población de genes mixta puede ser útil para la generación de cualquier proteína útil, por ejemplo interleucina I, anticuerpos, tPA y hormona de crecimiento. Esta estrategia puede usarse para generar proteínas que tengan especificidad o actividad modificada. La estrategia también puede ser útil para la generación de secuencias de ácido nucleico híbrido, por ejemplo, regiones promotoras, intrones, exones, secuencias potenciadoras, regiones de genes no traducidas en posición 3' o en posición 5'. Por tanto esta estrategia puede usarse para generar genes que tengan tasas de expresión aumentadas. Esta estrategia también puede ser útil en el estudio de secuencias de ADN repetitivo. Finalmente, esta estrategia puede ser útil para mutar ribozimas o aptámeros.

Las variantes de los polinucleótidos y polipéptidos descritos en el presente documento pueden obtenerse mediante el uso de ciclos repetidos de redistribución reductora, recombinación y selección que permiten la evolución molecular dirigida de secuencias lineales muy complejas, tales como ADN, ARN o proteínas, a través de recombinación.

La transposición de moléculas *in vivo* es útil proporcionando variantes y puede realizarse utilizando la propiedad natural de las células para recombinar multímeros. Aunque la recombinación *in vivo* ha proporcionado la principal vía natural de diversidad molecular, la recombinación genética continua siendo un proceso relativamente complejo que implica 1) el reconocimiento de homologías; 2) escisión de cadenas, invasión de cadenas, y etapas metabólicas que conducen a la producción de quiasma recombinante; y finalmente 3) la resolución de quiasma en moléculas recombinadas específicas. La formación del quiasma requiere el reconocimiento de secuencias homólogas.

Un polinucleótido híbrido puede producirse a partir de al menos un primer polinucleótido y un segundo polinucleótido, que puede compartir al menos una región de homología de secuencia parcial (por ejemplo, la SEC ID Nº: 1), e introducirse en una célula hospedadora adecuada. Las regiones de homología de secuencia parcial promueven procesos que dan como resultado la reorganización de secuencias produciendo un polinucleótido híbrido. La expresión "polinucleótido híbrido", como se usa en el presente documento, es cualquier secuencia de nucleótidos que se obtenga de tal método y que contenga secuencias de al menos dos secuencias polinucleotídicas originales. Dichos polinucleótidos híbridos pueden obtenerse a partir de sucesos de recombinación intermoleculares que promueven la integración de secuencias entre moléculas de ADN. Además, dichos polinucleótidos híbridos pueden obtenerse a partir de procesos de redistribución reductora intramolecular que utilizan secuencias repetidas para modificar una secuencia de nucleótidos dentro de una molécula de ADN.

Los polinucleótidos híbridos pueden codificar polipéptidos híbridos biológicamente activos (por ejemplo, una fitasa híbrida). Los polinucleótidos originales pueden codificar polipéptidos biológicamente activos. Los nuevos polipéptidos híbridos pueden ser producidos utilizando procesos celulares que integran la secuencia de los polinucleótidos originales de tal manera que el polinucleótido híbrido resultante codifica un polipéptido que demuestra actividades derivadas de los polipéptidos originales biológicamente activos. Por ejemplo, los polinucleótidos originales pueden codificar una enzima particular a partir de diferentes microorganismos. Una enzima codificada por un primer polinucleótido procedente de un organismo o variante puede, por ejemplo, actuar eficazmente en una condición ambiental particular, por ejemplo, alta salinidad. Una enzima codificada por un segundo polinucleótido procedente de un organismo o variante diferente puede actuar eficazmente en una condición ambiental diferente, tal como temperaturas extremadamente altas. Un polinucleótido híbrido que contenga secuencias del primer y segundo polinucleótido original puede codificar una enzima que presente características de ambas enzimas codificadas por los polinucleótidos originales. Por tanto, la enzima codificada por el polinucleótido híbrido puede actuar eficazmente en condiciones ambientales compartidas por cada una de las enzimas codificadas por el primer y segundo polinucleótido, por ejemplo, alta salinidad y temperaturas extremas.

Además de los diversos métodos descritos anteriormente, en la técnica pueden usarse diversos métodos conocidos para obtener polinucleótidos híbridos con propiedades enzimáticas potenciadas. Los siguientes ejemplos ilustran el uso de dichos procedimientos para obtener enzimas termoestables o termotolerantes por mutagénesis de un polinucleótido que codifica una enzima de interés de tipo silvestre.

Los métodos como los descritos por M. Lehmann et al. (en *Biochimica et Biophysica Acta* 1543: 408-415, 2000) describen una "estrategia consenso" donde se usó un alineamiento de secuencias de fitasas fúngicas homólogas para calcular una secuencia de aminoácidos de fitasa consenso. Después de la construcción del gen consenso correspondiente, la expresión recombinante y purificación, la fitasa recombinante obtenida mostró una temperatura de desplegamiento (T_m) de 15-22 °C mayor que la todas las fitasas parentales usadas en el diseño. La mutagénesis dirigida del gen que codifica la proteína recombinante se usó para aumentar adicionalmente el valor T_m a 90 °C. El efecto termoestabilizante se atribuyó a una combinación de cambios de aminoácidos múltiples que se distribuyeron sobre toda la secuencia de la proteína y principalmente afectó a los restos expuestos en la superficie.

Una enzima con propiedades térmicas potenciadas puede ser obtenida como descrito por L. Jermutus et al. (*J. of Biotechnology* 85: 15-24, 2001). En esta estrategia primero se restablecieron interacciones iónicas y enlaces de hidrógeno sobre la superficie de la fitasa de *Aspergillus terreus* que se correspondían con las presentes en la enzima homóloga, aunque más termoestable, de *A. niger*. Después todos los elementos estructurales secundarios se reemplazaron en la misma región y basándose en la estructura cristalina de la fitasa de *A. niger*. El reemplazo de una hélice α sobre la superficie de la fitasa de *A. terreus* por el correspondiente tramo de una fitasa de *A. niger* dio como resultado una enzima química basada en estructura (proteína de fusión) con termoestabilidad mejorada y actividad enzimática inalterada.

L. Giver et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 95: 12809-12813, 1998), describen un procedimiento donde se seis generaciones de mutagénesis al azar, introducidas durante PCR mutagénica de un polinucleótido que codifica la *p*-nitrobenilo esterasa de *Bacillus subtilis*, seguido de recombinación *in vitro*, basada en el método de Stemmer, dio como resultado una esterasa recombinante con termoestabilidad aumentada (aumento de T_m mayor de 14 °C) sin comprometer la actividad catalítica a temperaturas más bajas.

C. Vetriani et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 95: 12300-12305, 1998), describen un procedimiento mediante el cual se usó comparación de estructura directa y modelado basado en homología de las glutamato deshidrogenasas hexaméricas de las especies hipertermófilas *Pyrococcus furiosus* y *Thermococcus litoralis*, con temperaturas de crecimiento óptimas de 100 °C y 88 °C, respectivamente, para determinar características termoestabilizantes clave. Se modificó una interconexión par-ion intersubunitaria, que se observó que estaba sustancialmente reducida en la enzima menos estable, por mutagénesis de dos restos en su interior para reestablecer las interacciones encontradas en la enzima más estable. Aunque cualquier mutación sencilla tuvo efectos adversos sobre la termoestabilidad, con ambas mutaciones en el lugar, se observó una mejora de estabilidad a 104 °C multiplicada por cuatro sobre la enzima de tipo silvestre.

A. Tomschy et al. (*Protein Science* 9: 1304-1311, 2000), describen un procedimiento que utiliza la estructura cristalina de la fitasa de *Aspergillus Niger* (a 2,5 angstroms de resolución) para especificar todos sitios activos de la enzima. Después se usó un alineamiento de secuencias de aminoácidos múltiple para identificar restos de sitios activos no conservados que podrían correlacionarse con una propiedad de interés favorable. Usando esta estrategia, el Gln27 de la fitasa de *A. fumigatus*, que difiere de Leu27 de *A. niger*, se identificó como que probablemente estaba implicado en la unión y/o liberación al sustrato y como responsable de la menor actividad específica de la fitasa de *A. fumigatus* (26,5 frente a 196 6 U/mg de proteína a pH 5,0). La mutagénesis dirigida de Gln27 de la fitasa de *A. fumigatus* por Leu aumentó la actividad específica de la enzima mutante a 92,1 U/mg de proteína.

Plantas y Semillas Transgénicas

Las plantas y semillas transgénicas pueden comprender un ácido nucleico, un polipéptido, un casete de expresión,

mecanismo de clonación o vector de la invención, o una célula transfectada o transformada de la invención. Los productos vegetales, por ejemplo, aceites, semillas, hojas, extractos y similares, pueden comprender un ácido nucleico y/o un polipéptido de la invención. La planta transgénica puede ser dicotiledónea (una dicotiledónea) o monocotiledónea (una monocotiledónea). La planta o célula vegetal transgénica que expresa un polipéptido de la presente invención puede construirse de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 6.309.872.

La expresión recombinante, o sobreexpresión, de las moléculas de fitasa de la invención puede conseguirse en combinación con una o más moléculas adicionales, tales como, por ejemplo, otras enzimas. Este enfoque es útil para producir productos de combinación, tales como una planta o parte de planta que contenga las presentes moléculas de fitasa, así como una o más moléculas adicionales. Las moléculas de fitasa de la presente invención y las moléculas adicionales pueden usarse en un tratamiento de combinación. Las moléculas expresadas de forma recombinante resultantes pueden usarse en forma homogeneizada y/o purificada o como alternativa en forma relativamente no purificada (por ejemplo como partes de plantas consumibles que son útiles cuando se mezclan con otros productos alimentarios para catalizar la degradación del fitato).

Se proporcionan construcciones de expresión de ADN para la transformación de plantas con un gen que codifica fitasa bajo el control de secuencias reguladoras que son capaces de dirigir la expresión de fitasa. Estas secuencias reguladoras incluyen secuencias capaces de dirigir la transcripción en plantas, de forma constitutiva, o de maneras específicas de estadio y/o tejido.

La manera de la expresión depende, en parte, del uso de la planta o partes de la misma. Las plantas y órganos vegetales transgénicos proporcionados por la presente invención pueden aplicarse a una diversidad de procesos industriales directamente, por ejemplo, en piensos animales o, como alternativa, la fitasa expresada puede extraerse y, si se desea, purificarse antes de su aplicación. Como alternativa, la planta o parte de la planta hospedadora recombinante puede usarse directamente. Los métodos para catalizar reacciones de hidrolización de fitato pueden usar semillas que contienen cantidades potenciadas de fitasa. El método implica poner en contacto semillas transgénicas, no naturales, por ejemplo, en una forma molida o masticable, con sustrato que contiene fitato y permitir que las enzimas en las semillas aumenten la velocidad de reacción. Añadiendo directamente las semillas a un sustrato que contiene fitato, la invención proporciona una solución para el proceso caro y problemático de extraer y purificar la enzima. A un organismo que carezca de un aporte suficiente de una enzima se puede administrar la enzima en forma de semillas que contienen cantidades potenciadas de la enzima. El momento de la administración de la enzima a un organismo puede coordinarse con el consumo de un producto alimentario que contiene fitato.

La expresión de fitasa en plantas puede conseguirse por una diversidad de medios. Específicamente, por ejemplo, está disponible tecnología para transformar un gran número de especies vegetales, incluyendo especies dicotiledóneas (por ejemplo, tabaco, patata, tomate, *Petunia*, *Brassica*) y especies monocotiledóneas. Adicionalmente, por ejemplo, están disponibles estrategias para la expresión de genes ajenos en plantas. Adicionalmente además, se han identificado secuencias reguladoras de genes vegetales que son útiles para la construcción de genes quiméricos que pueden expresarse funcionalmente en plantas y en células vegetales (por ejemplo, Klee (1987) *Ann. Rev. of Plant Phys.* 38: 467-486; Clark *et al.* (1990) *Virology Dec*; 179(2): 640-7; Smith *et al.* (1990) *Mol. Gen. Genet. Dec*; 224(3): 477-81.

La introducción de construcciones génicas en plantas puede conseguirse usando varias tecnologías incluyendo transformación con *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes*. Los ejemplos no limitantes de tejidos vegetales que pueden transformarse incluyen de este modo protoplastos, microsporas o polen, y explantes tales como hojas, tallos, raíces, hipocótilos y cotiledones. Además, puede introducirse ADN directamente en protoplastos y células o tejidos vegetales por microinyección, electroporación, bombardeo de partículas y captación de ADN directa.

Pueden producirse proteínas en plantas por una diversidad de sistemas de expresión. Por ejemplo, el uso de un promotor constitutivo tal como el promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (Guilley *et al.*, 1982) es útil para la acumulación de la proteína expresada en prácticamente todos los órganos de la planta transgénica. Como alternativa, el uso de promotores que son altamente específicos de tejido y/o específicos de estadio es útil para la presente invención (Higgins, 1984; Shotweel, 1989) para desviar la expresión hacia tejidos deseados y/o hacia un estadio deseado del desarrollo.

Los protocolos para expresión en plantas de moléculas de fitasa de la presente invención se desvelan en, por ejemplo, la Patente de Estados N° 5.770.413 (Van Ooijen *et al.*) y Patente de Estados N° 5.593.963 (Van Ooijen *et al.*), que enseña el uso de fitasas fúngicas.

Modificación de Secuencias Codificantes y Secuencias Adyacentes

La expresión transgénica en plantas de genes derivados de fuentes heterológicas puede implicar la modificación de esos genes para conseguir y optimizar su expresión en plantas. En particular, las ORF bacterianas que codifican enzimas separadas pero que se codifican por el mismo transcrito en el microbio nativo se expresan mejor en plantas

en transcritos separados. Para conseguir esto, cada ORF microbiana se aísla individualmente y se clona dentro de un casete que proporciona una secuencia promotora vegetal en el extremo 5' de la ORF y un terminador de transcripción de plantas en el extremo 3' de la ORF. La secuencia de ORF aislada puede incluir el codón ATG de inicio y el codón de terminación terminal, pero puede incluir la secuencia adicional más allá del codón ATG de inicio y el de terminación. Además, la ORF puede estar truncada, pero conservar aún la actividad requerida; para ORF particularmente largas, pueden ser preferibles versiones truncadas que conserven la actividad para expresión en organismos transgénicos. Los "promotores vegetales" y "terminadores de la transcripción vegetales" que pueden usarse incluyen cualquier promotor y/o terminador de la transcripción que actúe dentro de células vegetales. Esto incluye promotores y terminadores de la transcripción que pueden derivar de fuentes no vegetales tales como virus (un ejemplo es el Virus del Mosaico de la Coliflor).

En algunos casos, no se requiere modificación de las secuencias codificantes de ORF y secuencia adyacente. Es suficiente aislar un fragmento que contiene la ORF de interés e insertarla cadena abajo de un promotor vegetal. Por ejemplo, Gaffney *et al.* (Science 261: 754-756 (1993)) han expresado el gen *nahG* de *Pseudomonas* en plantas transgénicas bajo el control del promotor 35S de CaMV y el terminador *tml* de CaMV con éxito sin modificación de la secuencia codificante y con nucleótidos del gen de *Pseudomonas* cadena arriba del ATG aún unido, y nucleótidos cadena abajo del codón de terminación aún unido a la ORF de *nahG*. Preferentemente debería dejarse tan poca secuencia microbiana adyacente unida cadena arriba del codón ATG como cadena abajo del de terminación. En la práctica, dicha construcción puede depender de la disponibilidad de sitios de restricción.

En otros casos, la expresión de genes derivados de fuentes microbianas puede causar problemas en la expresión. Estos problemas se han caracterizado bien en la técnica y son particularmente habituales con genes derivados de ciertas fuentes microbianas. Estos problemas pueden aplicarse a la secuencia de nucleótidos de la presente invención y la modificación de estos genes puede llevarse a cabo usando técnicas bien conocidas ahora en este campo. Pueden encontrarse los siguientes problemas:

Uso codónico

La invención proporciona ácidos nucleicos que tienen codones modificados para su uso en plantas; en algunos casos el uso codónico preferido en plantas difiere del uso codónico preferido en ciertos microorganismos. La comparación del uso de los codones dentro una ORF microbiana clonada con su uso en genes vegetales (y en particular genes de la planta diana) permitirá una identificación de los codones dentro de la ORF que debería preferentemente cambiarse. La evolución vegetal típicamente ha tendido hacia una fuerte preferencia de los nucleótidos C y G en la tercera posición de base de monocotiledóneas, mientras que las dicotiledóneas usan con frecuencia los nucleótidos A o T en esta posición. Modificando un gen para incorporar el uso codónico preferido para una especie transgénica diana particular, se superarán muchos de los problemas descritos posteriormente con respecto a contenido de GC/AT y corte y empalme erróneo.

Contenido de GC/AT

La invención proporciona ácidos nucleicos que tienen su contenido de GC modificado, por ejemplo, para su uso en plantas; los genes vegetales típicamente tienen un contenido de GC de más del 35%. Las secuencias de ORF que son ricas en nucleótidos A y T pueden provocar varios problemas en plantas. En primer lugar, se cree que los motivos de ATTTA provocan desestabilización de mensajes y se encuentran en el extremo 3' de muchos ARNm de vida corta. En segundo lugar, se cree que la aparición de señales de poliadenilación tales como AATAAA en posiciones inapropiadas dentro del mensaje provoca truncamiento prematuro de la transcripción. Además, las monocotiledóneas pueden reconocer secuencias ricas en AT como sitios de corte y empalme (véase posteriormente).

Secuencias Adyacentes a la Metionina de Inicio

La invención proporciona ácidos nucleicos que tienen nucleótidos adyacentes al ATG modificado y/o añadido; las plantas difieren de los microorganismos porque sus mensajes no poseen un sitio de unión a ribosomas definido. En su lugar, se cree que los ribosomas se unen al extremo 5' del mensaje y exploran con respecto al primer ATG disponible en el que iniciar la traducción. No obstante, se cree que hay una preferencia por ciertos nucleótidos adyacentes al ATG y que la expresión de genes microbianos puede potenciarse por la inclusión de un iniciador de la traducción consenso eucariota en el ATG. Clontech (catálogo 1993/1994, página 210, incorporado en el presente documento por referencia) ha sugerido una secuencia como un iniciador de la traducción consenso para la expresión del gen *uidA* de *E. coli* en plantas. Además, Joshi (N.A.R. 15: 6643-6653 (1987), incorporado en el presente documento por referencia) ha comparado muchas secuencias vegetales adyacentes al ATG y sugiere otra secuencia consenso. En situaciones en las que se encuentran dificultades en la expresión de ORF microbianas en plantas, la inclusión de una de estas secuencias en el ATG de inicio puede mejorar la traducción. En dichos casos los últimos tres nucleótidos del consenso pueden no ser apropiados para su inclusión en la secuencia modificada debido a su modificación del segundo resto de AA. En algunos aspectos, las secuencias preferidas adyacentes a la metionina de inicio pueden diferir entre diferentes especies vegetales. Un estudio de 14 genes de maíz localizados en la base de datos de GenBank proporcionó los siguientes resultados:

Posición antes del ATG de inicio en 14 genes de maíz:

	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1
C	3	8	4	6	2	5	6	0	10	7
T	3	0	3	4	3	2	1	1	1	0
A	2	3	1	4	3	2	3	7	2	3
G	6	3	6	0	6	5	4	6	1	5

5 Este análisis puede realizarse para la especie vegetal deseada en la que se incorpora la secuencia de nucleótidos, y la secuencia adyacente al ATG modificado para incorporar los nucleótidos preferidos.

Retiradas de sitios de corte y empalme erróneo

10 La invención proporciona ácidos nucleicos que tienen sitios de corte y empalme erróneo modificados o retirados o "inactivados" funcionalmente; los genes clonados de fuentes de no vegetales y no optimizados para expresión en plantas también pueden contener motivos que puedan reconocerse en plantas como sitios de corte y empalme 5' o 3', y pueden escindirse, generando de este modo mensajes truncados o suprimidos. Estos sitios pueden retirarse usando las técnicas bien conocidas en este campo.

15 Se conocen bien en este campo técnicas para la modificación de secuencias codificantes y secuencias adyacentes. En casos en los que la expresión inicial de una ORF microbiana es baja y se considera apropiado hacer alteraciones en la secuencia como se ha descrito anteriormente, entonces la construcción de genes sintéticos puede conseguirse de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Estos se describen, por ejemplo, en las divulgaciones de patentes publicadas EP 0 385 962 (de Monsanto), EP 0 359 472 (de Lubrizol) y WO 93/07278 (de Ciba-Geigy), todas las cuales son incorporadas en el presente documento por referencia. En la mayoría de los casos es preferible ensayar la expresión de las construcciones génicas usando protocolos de ensayo transitorios (que se conocen bien en este campo) antes de su transferencia a plantas transgénicas.

25 Promotores vegetales

30 Las composiciones de la invención pueden contener secuencias de ácido nucleico, por ejemplo, promotores, por ejemplo, para transformación y expresión en una planta de interés. Las secuencias de ácido nucleico pueden estar presentes en construcciones de ADN o casetes de expresión. Los ácidos nucleicos de la invención pueden ser, o comprender, "casetes de expresión", incluyendo cualquier molécula de ácido nucleico capaz de dirigir la expresión de una secuencia de nucleótidos particular en una célula hospedadora apropiada que comprende un promotor unido operativamente a la secuencia de nucleótidos de interés que está unida operativamente a señales de terminación.

35 Las composiciones (por ejemplo, secuencias de ácido nucleico) de la invención también pueden comprender secuencias requeridas para la traducción apropiada de la secuencia de nucleótidos. La región codificante habitualmente codifica una proteína de interés pero también puede codificar un ARN funcional de interés, por ejemplo ARN antisentido o un ARN no traducido, en la dirección con sentido o antisentido. El casete de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos de interés puede ser quimérico, lo que significa que al menos uno de sus componentes es heterólogo con respecto a al menos uno de sus otros componentes. El casete de expresión también pueden ser de origen natural pero que se haya obtenido en una forma recombinante útil para expresión heteróloga. Típicamente, sin embargo, el casete de expresión es heterólogo con respecto al hospedador, es decir, la secuencia de ADN particular del casete de expresión no aparece de forma natural en la célula hospedadora y debe haberse introducido en la célula hospedadora o un ancestro de la célula hospedadora por un acontecimiento de transformación. La expresión de la secuencia de nucleótidos en el casete de expresión puede estar bajo el control de un promotor constitutivo o de un promotor inducible que inicia la transcripción solamente cuando la célula hospedadora se expone a algún estímulo externo particular. Adicionalmente, el promotor también puede ser específico de un tejido u órgano particular o estadio de desarrollo.

50 La presente invención abarca la transformación de plantas con casetes de expresión capaces de expresar polinucleótidos. El casete de expresión incluirá en la dirección 5'-3' de transcripción, una región de inicio de la transcripción y de la traducción (es decir, un promotor) y un polinucleótido de interés. El casete de expresión puede comprender opcionalmente una región de terminación de la transcripción y de la traducción (es decir, región de terminación) funcional en plantas. En algunas realizaciones, el casete de expresión comprende un gen marcador seleccionable para permitir la selección de transformantes estables. Las construcciones de expresión de la invención también pueden comprender una secuencia líder y/o una secuencia que permite la expresión inducible del polinucleótido de interés. Véase, Guo *et al.* (2003) Plant J. 34: 383-92 y Chen *et al.* (2003) Plant J. 36: 731-40 para ejemplos de secuencias que permiten la expresión inducible.

60 Las secuencias reguladoras de la construcción de expresión están unidas operativamente al polinucleótido de interés. Por "unidas operativamente" se entiende un enlace funcional entre el promotor y una segunda secuencia donde la secuencia promotora inicia y media en la transcripción de la secuencia de ADN correspondiente a la

segunda secuencia. En general, unido operativamente significa que las secuencias de nucleótidos que se unen son contiguas.

Puede usarse cualquier promotor capaz de conducir la expresión en la planta de interés. El promotor puede ser nativo o análogo o ajeno o heterólogo del hospedador vegetal. Los términos "heterólogo" y "exógeno" cuando se usan en el presente documento para hacer referencia a una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, una secuencia de ADN o ARN) o un gen, se refieren a una secuencia que se origina de una fuente ajena a la célula hospedadora particular o, si es de la misma fuente, se modifica de su forma original. Por lo tanto, un gen heterólogo en una célula hospedadora incluye un gen que es endógeno de la célula hospedadora particular pero se ha modificado. Los términos también incluyen múltiples copias de origen no natural de una secuencia de ADN de origen natural. Por lo tanto, los términos se refieren a un segmento de ADN que es ajeno o heterólogo de la célula, u homólogo de la célula pero en una posición dentro del ácido nucleico de la célula hospedadora en la que habitualmente no se encuentra el elemento. Se expresan segmentos de ADN exógenos para producir polipéptidos exógenos. En realizaciones alternativas, una secuencia de ácido nucleico "homóloga" (por ejemplo ADN) es una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo ADN o ARN) asociado de forma natural con una célula hospedadora en la que se introduce.

La elección de promotores para incluir depende de varios factores, incluyendo, pero sin limitación, eficacia, elegibilidad, capacidad de inducción, nivel de expresión deseado y expresión preferente en célula o tejido. Para un experto en la materia es un asunto rutinario modular la expresión de una secuencia seleccionando y posicionando de forma apropiada promotores y regiones reguladoras en relación con esa secuencia.

Algunos promotores adecuados inician la transcripción solamente, o predominantemente, en ciertos tipos celulares. Por lo tanto, como se usa en el presente documento, un promotor con preferencia de tipo celular o tejido es uno que conduce la expresión preferentemente en el tejido diana, pero también puede conducir a algo de expresión en otros tipos celulares o tejidos. Los métodos para identificar y caracterizar regiones promotoras en ADN genómico vegetal incluyen, por ejemplo, los descritos en las siguientes referencias: Jordano, *et al.*, *Plant Cell*, 1: 855-866 (1989); Bustos, *et al.*, *Plant Cell*, 1: 839-854 (1989); Green, *et al.*, *EMBO J.* 7, 4035-4044 (1988); Meier, *et al.*, *Plant Cell*, 3, 309-316 (1991); y Zhang, *et al.*, *Plant Physiology* 110: 1069-1079 (1996).

Se han indicado en plantas varios genes y/o promotores regulados con preferencia de tejido. Algunos genes con preferencia de tejido indicados incluyen los genes que codifican las proteínas de almacenamiento de semillas (tales como napina, cruciferina, beta-conglicina y faseolina, prolaminas, glutelinas, globulinas y zeínas), zeínas o proteínas de cuerpos oleosos (tales como oleosina) o genes implicados en la biosíntesis de ácidos grasos (incluyendo proteína transportadora de acilo, esteroil-ACP desaturasa y desaturasas de ácidos grasos (fad 2-1)), y otros genes expresados durante el desarrollo embrionario (tales como Bce4, véase, por ejemplo, documento EP 255378 y Kridl *et al.*, (1991) *Seed Science Research*, 1: 209).

Los ejemplos de promotores específicos de tejido, que se han descrito, incluyen la lectina (Vodkin, *Prog. Clin. Biol.*, res., 138: 87 (1983); Lindstrom *et al.*, (1990) *Dev. Genet.*, 11: 160), alcohol deshidrogenasa de maíz 1 (Dennis *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 12: 3983 (1984)), complejo de fotocaptación del maíz (véase, por ejemplo, Simpson, (1986) *Science*, 233: 34; Bansal (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 3654), proteína de choque térmico del maíz (véase, por ejemplo, Odell *et al.*, (1985) *Nature*, 313: 810); carboxilasa de RuBP de subunidad pequeña del guisante (véase, por ejemplo, Poulsen *et al.*, (1986) *Mol. Gen. Genet.*, 205: 193-200; Cashmore *et al.*, (1983) *Gen. Eng. of Plants*, Plenum Press, Nueva York, 29-38); manopina sintasa de plásmido Ti (véase, por ejemplo, Langridge *et al.*, (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 3219-3223), nopalina sintasa de plásmido Ti (Langridge *et al.*, (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 3219-3223), chalcona isomerasa de petunia (véase, por ejemplo, vanTunen (1988) *EMBO J.* 7: 1257); proteína rica en glicina 1 de judía (véase, por ejemplo, Keller (1989) *Genes Dev.* 3: 1639); 35S de CaMV truncado (véase, por ejemplo, Odell (1985) *Nature* 313: 810); patatina de patata (véase, por ejemplo, Wenzler (1989) *Plant Mol. Biol.* 13: 347); célula de la raíz (véase, por ejemplo, Yamamoto (1990) *Nucleic Acids Res.* 18: 7449); zeína del maíz (véase, por ejemplo, Reina (1990) *Nucleic Acids Res.* 18: 6425; Lopes *et al.* (1995) *Mol. Gen. Genet.* 247: 603-613; Kriz (1987) *Mol. Gen. Genet.* 207: 90; Wandelt (1989) *Nucleic Acids Res.*, 17: 2354; Langridge (1983) *Cell*, 34:1015; Reina (1990) *Nucleic Acids Res.*, 18: 7449), promotor de ADP-gpp (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 7.102.057); globulina-1 (véase, por ejemplo, Belanger (1991) *Genetics* 129: 863); α -globulina (Sunilkumar, *et al.* (2002), *Transgenic Res.* 11: 347-359); α -tubulina; cab (véase, por ejemplo, Sullivan (1989) *Mol. Gen. Genet.*, 215: 431); PEPCasa (véase por ejemplo, Hudspeth & Grula, (1989) *Plant Molec. Biol.*, 12: 579-589); promotores asociados a un complejo génico R (Chandler *et al.*, (1989) *Plant Cell*, 1: 1175); promotor de vicilina del guisante (Czako *et al.*, (1992) *Mol. Gen. Genet.*, 235: 33; Patente de Estados Unidos N° 5.625.136); promotor de GTL1 (Takaiwa *et al.* (1991) *Plant Mol. Biol.* 16 (1), 49-58); promotores de chalcona sintasa (Franken *et al.*, (1991) *EMBO J.*, 10: 2605); promotor de GY1 (Sims & Goldberg (1989) *Nuc. Acid Res.* 17(11) 4368) y similares.

Pueden usarse promotores preferidos en frutos, incluyendo cualquier clase de promotores preferidos en frutos, por ejemplo, como se expresa en o durante la antétesis hasta el desarrollo del fruto, al menos hasta el comienzo de la maduración, por ejemplo, como se analiza en el documento US 4.943.674. El promotor para el gen de la poligalacturonasa está activo en la maduración del fruto. Puede usarse el gen de la poligalacturonasa como se describe, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 4.535.060, Patente de Estados Unidos N° 4.769.061,

Patente de Estados Unidos N° 4.801.590 y Patente de Estados Unidos N° 5.107.065.

Puede usarse cualquier promotor con preferencia de tejido, incluyendo los que dirigen la expresión en células de las hojas después de daño a la hoja (por ejemplo, de insectos masticadores), en tubérculos (por ejemplo, promotor del gen de patatina) y en células de fibras (un ejemplo de una proteína de célula de fibra regulada por desarrollo es E6 (John y Crow (1992) PNAS 89: 5769-5773). El gen E6 está más activo en fibra, aunque se encuentran bajos niveles de transcritos en hoja, óvulo y flor.

Pueden usarse promotores activos en tejido fotosintético, por ejemplo, para dirigir la transcripción en tejidos verdes tales como hojas y tallos, que son adecuados cuando conducen la expresión solamente o predominantemente en dichos tejidos. Como alternativa, pueden usarse promotores para conferir expresión constitutivamente en toda la planta, o diferencialmente con respecto a los tejidos verdes, o diferencialmente con respecto al estadio del desarrollo del tejido verde en el que se produce la expresión, o en respuesta a estímulos externos.

Los promotores ejemplares incluyen los promotores de ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa (RbcS) tales como el promotor de RbcS de alerce americano oriental (*Larix laricina*), el promotor de cab6 de pino (Yamamoto *et al.*, (1994) Plant Cell Physiol. 35: 773-778), el promotor del gen Cab-1 de trigo (Fejes *et al.* (1990) Plant Mol. Biol. 15: 921-932), el promotor de CAB-1 de la espinaca (Lubberstedt *et al.* (1994) Plant Physiol. 104: 997-1006), el promotor de cab1R del arroz (Luan *et al.* (1992) Plant Cell 4: 971-981), el promotor de piruvato ortofosfato diquinasa (PPDK) de maíz (Matsuoka *et al.* (1993) Proc Natl Acad Sci USA 90: 9586-9590), el promotor de Lhcb1*2 del tabaco (Cerdan *et al.* (1997) Plant Mol. Biol. 33: 245-255), el promotor de importador de sacarosa H+ de *Arabidopsis thaliana* SUC2 (Truernit *et al.* (1995) Planta 196: 564-570), y promotores de proteína de membrana tilacoide de espinaca (psaD, psaF, psaE, PC, FNR, atpC, atpD, cab, rbcS). Otros promotores que conducen la transcripción en tallos, hojas y tejidos verdes se describen en la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 2007/0006346.

La especificidad tisular de algunos promotores con "preferencia de tejido" puede no ser absoluta y puede ensayarse con genes indicadores tales como Gus o proteína verde fluorescente, proteína cian fluorescente, proteína amarilla fluorescente o proteína roja fluorescente. También puede conseguirse expresión con preferencia de tejido con expresión "filtrante" por una combinación de diferentes promotores con preferencia de tejido. Otros promotores con preferencia de tejido pueden aislarse por un experto en la materia (véase documento 5.589.379).

Pueden usarse promotores vegetales que son inducibles tras su exposición a hormonas vegetales, tales como auxinas, para expresar los ácidos nucleicos de la invención. Por ejemplo, estos pueden usar el fragmento del promotor de los elementos de respuesta a auxina E1 (AuxRE) en la soja (*Glycine max* L.) (Liu (1997) Plant Physiol. 115: 397-407); el promotor de GST6 de *Arabidopsis* sensible a auxina (también sensible a ácido salicílico y peróxido de hidrógeno) (Chen (1996) Plant J. 10: 955-966); el promotor de parC inducible por auxina de tabaco (Sakai (1996) 37: 906-913); un elemento de respuesta a biotina vegetal (Streit (1997) Mol. Plant Microbe Interact. 10: 933-937); y el promotor sensible a la hormona de tensión ácido abscísico (Sheen (1996) Science 274: 1900-1902).

Los ácidos nucleicos de la invención también pueden unirse operativamente a promotores vegetales que son inducibles tras su exposición a reactivos químicos que pueden aplicarse a la planta, tales como herbicidas o antibióticos. Por ejemplo, los sistemas de expresión génica que se activan en presencia de un ligando químico, incluyendo etanol, tales como pueden encontrarse en los documentos WO 96/27673; WO 93/01294; WO 94/03619; WO 02/061102. Puede usarse el promotor de In2-2 de maíz, activado por protectores herbicidas de bencenosulfonamida (De Veylder (1997) Plant Cell Physiol. 38: 568-577); la aplicación de diferentes protectores herbicidas induce patrones de expresión génica definidos, incluyendo expresión en la raíz, hidátodos y el meristemo apical del brote. La secuencia codificante puede estar bajo el control de, por ejemplo, un promotor inducible por tetraciclina, por ejemplo, como se describe con plantas de tabaco transgénicas que contienen el gen de arginina descarboxilasa de *Avena sativa* L. (avena) (Masgrau (1997) Plant J. 11: 465-473); estrógeno, tal como el receptor de ecdisona (documento WO 01/52620) o un elemento sensible a ácido salicílico (Stange (1997) Plant J. 11: 1315-1324). Usando promotores inducidos químicamente (por ejemplo, por hormonas o pesticidas), es decir, promotor sensible a un producto químico que puede aplicarse a la planta transgénica en el campo, puede inducirse la expresión de un polipéptido de la invención en un estadio de desarrollo particular de la planta.

Los promotores constitutivos ejemplares que pueden usarse y que se han descrito, incluyen actina de arroz 1 (Wang *et al.* (1992) Mol. Cell. Biol., 12: 3399; Patente de Estados Unidos N° 5.641.876); otras isoformas de actina (McElroy *et al.* (1990) Plant Cell 2: 163-171 y McElroy *et al.* (1991) Mol. Genet. 231: 150-160); los promotores 35S de CaMV (Odell *et al.* (1985) Nature, 313: 810); 19S de CaMV (Lawton *et al.* (1987) Plant Mol. Biol. 9: 315-324; Patente de Estados Unidos N° 5.639.949); nos (Ebert *et al.* (1987) PNAS USA 84: 5745-5749); Adh (Walker *et al.* (1987) PNAS USA 84: 6624-6628), sacarosa sintasa (Yang & Russell (1990) PNAS USA 87: 4144-4148); y ubiquitina (por ejemplo girasol - Binet *et al.* (1991) Plant Science 79: 87-94; maíz - Christensen *et al.* (1989) Plant Molec. Biol. 12: 619-632; y *Arabidopsis* - Callis *et al.*, J. Biol. Chem. (1990) 265:12486-12493; y Norris *et al.*, Plant Mol. Biol. (1993) 21: 895-906.

Puede usarse cualquier terminador de la transcripción, por ejemplo, en vectores, casetes de expresión y similares. Estos son responsables de la terminación de la transcripción más allá del transgén y poliadenilación de ARNm

correcta. La región de terminación puede ser nativa con la región de inicio de la transcripción, puede ser nativa con la secuencia de ADN unida operativamente de interés, puede ser nativa con el hospedador vegetal o puede derivar de otra fuente (es decir, ajena o heteróloga del promotor, la secuencia de ADN de interés, el hospedador vegetal o cualquier combinación de los mismos). Son terminadores de la transcripción apropiados los que se sabe que actúan en plantas e incluyen el terminador de 35S de CAMV, el terminador de tml, el terminador de nopalina sintasa y el terminador de rbcS E9 de guisante. Estos pueden usarse tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas. Además, puede usarse el terminador de la transcripción nativo de un gen.

Puede usarse cualquier secuencia para potenciar la expresión génica desde dentro de la unidad transcripcional; y estas secuencias pueden usarse junto con los genes de la presente invención para aumentar su expresión en plantas transgénicas. Por ejemplo, se ha mostrado que diversas secuencias intrónicas potencian la expresión, particularmente en células monocotiledóneas. Por ejemplo, se ha descubierto que los intrones del gen Adhl de maíz potencia significativamente la expresión del gen natural bajo su promotor afín cuando se introducen en células de maíz. También se sabe que varias secuencias líder no traducidas derivadas de virus potencian la expresión, y estas son particularmente eficaces en células dicotiledóneas. Específicamente, se ha mostrado que las secuencias líder del Virus del Mosaico del Tabaco (TMV, la "secuencia W"), Virus de las Manchas Cloróticas del Maíz (MCMV) y Virus del Mosaico de la Alfalfa (AMV) son eficaces en la potenciación de la expresión (por ejemplo Gallie *et al.* Nucl. Acids Res. 15: 8693-8711 (1987); Skuzeski *et al.* Plant Molec. Biol. 15: 65-79 (1990)).

Dirección del producto génico dentro de la célula

Puede usarse cualquier mecanismo para dirigir productos génicos, por ejemplo, en plantas, y se sabe que dichos mecanismos existen en plantas y las secuencias que controlan el funcionamiento de estos mecanismos se han caracterizado en cierto detalle. Se han caracterizado secuencias que provocan la dirección de los productos génicos a otros compartimentos celulares. Las secuencias amino terminales pueden ser responsables de dirigir una proteína de interés a cualquier compartimento celular, tal como una vacuola, mitocondria, peroxisoma, cuerpos proteicos, retículo endoplásmico, cloroplasto, gránulo de almidón, amiloplasto, apoplasto o pared celular de una planta (por ejemplo Unger *et al.* Plant Molec. Biol. 13: 411-418 (1989); Rogers *et al.* (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6512-651; Patente de Estados Unidos N° 7.102.057; documento WO 2005/096704). Opcionalmente, la secuencia señal puede ser una secuencia señal N terminal de waxy, una secuencia señal N terminal de γ -zeína, un dominio de unión de almidón, un dominio de unión de almidón C terminal, una secuencia de dirección de cloroplastos, que importa la proteína madura al cloroplasto (Comai *et al.* (1988) J. Biol. Chem. 263: 15104-15109; van den Broeck, *et al.* (1985) Nature 313: 358-363; Patente de Estados Unidos N° 5.639.949) o una secuencia señal de secreción de células de aleurona (Koehler & Ho, Plant Cell 2: 769-783 (1990)). Adicionalmente, secuencias amino terminales junto con secuencias carboxilo terminales son responsables de la dirección vacuolar de productos génicos (Shinshi *et al.* (1990) Plant Molec. Biol. 14: 357-368).

La secuencia señal detectada debería incluir opcionalmente el sitio de escisión conocido, y la fusión construida debería tener en cuenta cualquier aminoácido después del sitio o los sitios de escisión, que se requieren para la escisión. En algunos casos, este requisito puede cumplirse por la adición de un número pequeño de aminoácidos entre el sitio de escisión y el ATG del transgén o, como alternativa, el reemplazo de algunos aminoácidos dentro de la secuencia del transgén. Estas técnicas de construcción se conocen bien en este campo y pueden aplicarse igualmente a cualquier compartimento celular.

Los mecanismos anteriormente descritos para la dirección celular pueden utilizarse no solamente junto con sus promotores afines, sino también con promotores heterólogos para efectuar un objetivo de dirección celular específico bajo la regulación transcripcional de un promotor que tiene un patrón de expresión diferente al del promotor del que deriva la señal de dirección.

En suma, puede usarse una diversidad de medios, incluyendo cualquier medio para conseguir la expresión recombinante de fitasa en una planta transgénica, semilla, órgano o cualquier parte de planta. Dichas plantas transgénicas y partes de plantas son útiles como fuentes de fitasa expresada de forma recombinante, que pueden añadirse directamente a fuentes que contienen fitato. Como alternativa, la fitasa expresada en plantas recombinantes puede extraerse de la fuente vegetal y, si se desea, purificarse antes de entrar en contacto con el sustrato de fitasa.

Las plantas que pueden seleccionarse incluyen, pero sin limitación, cultivos que producen flores comestibles tales como coliflor (*Brassica oleracea*), alcachofa (*Cynara scolymus*), frutas tales como manzana (*Malus*, por ejemplo *domesticus*), banana (*Musa*, por ejemplo *acuminata*), bayas (tales como la grosella, *Ribes*, por ejemplo *rubrum*), cerezas (tales como la cereza dulce, *Prunus*, por ejemplo *avium*), pepino (*Cucumis*, por ejemplo *sativus*), uva (*Vitis*, por ejemplo *vinifera*), limón (*Citrus limon*), melón (*Cucumis melo*), nueces (tales como la nuez, *Juglans*, por ejemplo *regia*; cacahuete, *Arachis hypogaeae*), naranja (*Citrus*, por ejemplo *maxima*), melocotón (*Prunus*, por ejemplo *persica*), pera (*Pyra*, por ejemplo *communis*), ciruela (*Prunus*, por ejemplo *domestica*), fresa (*Fragaria*, por ejemplo *moschata*), tomate (*Lycopersicon*, por ejemplo *esculentum*), hojas, tales como alfalfa (*Medicago*, por ejemplo *sativa*), coles (por ejemplo *Brassica oleracea*), endivia (*Cichoreum*, por ejemplo *endivia*), puerro (*Allium*, por ejemplo *porrum*), lechuga (*Lactuca*, por ejemplo *sativa*), espinaca (*Spinacia*, por ejemplo *oleraceae*), tabaco (*Nicotiana*, por

- ejemplo *tabacum*), raíces, tales como arrurruz (*Maranta*, por ejemplo *arundinacea*), remolacha (*Beta*, por ejemplo *vulgaris*), zanahoria (*Daucus*, por ejemplo *carota*), yuca (*Manihot*, por ejemplo *esculenta*), nabo (*Brassica*, por ejemplo *rapa*), rábano (*Raphanus*, por ejemplo *sativus*), ñame (*Dioscorea*, por ejemplo *esculenta*), batata (*Ipomoea batatas*) y semillas, tales como judía (*Phaseolus*, por ejemplo *vulgaris*), guisante (*Pisum*, por ejemplo *sativum*), soja (*Glycin*, por ejemplo *max*), trigo (*Triticum*, por ejemplo *aestivum*), cebada (*Hordeum*, por ejemplo *vulgare*), maíz (*Zea*, por ejemplo *mays*), arroz (*Oryza*, por ejemplo *sativa*), colza (*Brassica napus*), mijo (*Panicum* L.), girasol (*Helianthus annuus*), avena (*Avena sativa*), tubérculos, tales como colirrábano (*Brassica*, por ejemplo *oleraceae*), patata (*Solanum*, por ejemplo *tuberosum*) y similares.
- 10 Los ácidos nucleicos y polipéptidos de la invención pueden expresarse en o se insertan en cualquier planta o semilla. Las plantas transgénicas pueden ser dicotiledóneas o monocotiledóneas. Son ejemplos de plantas transgénicas monocotiledóneas de la invención los pastos, tales como poa (pasto azul, *Poa*), pasto de forraje tal como festuca, lolium, pastos templados, tales como *Agrostis*, y cereales, por ejemplo, trigo, avena, centeno, cebada, arroz, sorgo y maíz. Son ejemplos de plantas transgénicas dicotiledóneas de la invención el tabaco, legumbres tales como altramuces, patata, remolacha azucarera, guisante, judía y soja, y plantas crucíferas (familia *Brassicaceae*), tales como coliflor, colza y el organismo modelo cercanamente relacionado *Arabidopsis thaliana*. Por lo tanto, las plantas y semillas transgénicas incluyen una amplia serie de plantas, incluyendo, pero sin limitación, especies de los géneros *Anacardium*, *Arachis*, *Asparagus*, *Atropa*, *Avena*, *Brassica*, *Citrus*, *Citrullus*, *Capsicum*, *Carthamus*, *Cocos*, *Coffea*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Daucus*, *Elaeis*, *Fragaria*, *Glycine*, *Gossypium*, *Helianthus*, *Heterocallis*, *Hordeum*, *Hyoscyamus*, *Lactuca*, *Linum*, *Lolium*, *Lupinus*, *Lycopersicon*, *Malus*, *Manihot*, *Majorana*, *Medicago*, *Nicotiana*, *Olea*, *Oryza*, *Panicum*, *Pannisetum*, *Persea*, *Phaseolus*, *Pistachia*, *Pisum*, *Pyrus*, *Prunus*, *Raphanus*, *Ricinus*, *Secale*, *Senecio*, *Sinapis*, *Solanum*, *Sorghum*, *Theobromus*, *Trigonella*, *Triticum*, *Vicia*, *Vitis*, *Vigna*, y *Zea*.
- 15
- 20 Los ácidos nucleicos de la invención pueden expresarse en plantas que contienen células de fibras, incluyendo, por ejemplo, algodón, árbol de algodón de seda (*Ceiba*, *Ceiba pentandra*), sauce del desierto, gobernadora, *Krascheninnikovia*, balsa, ramio, kenaf, cáñamo, jamaica, jute, sisal, abaca y lino. Las plantas transgénicas pueden ser miembros del género *Gossypium*, incluyendo miembros de cualquier especie de *Gossypium*, tales como *G. arboreum*; *G. herbaceum*, *G. barbadense* y *G. hirsutum*.
- 25
- 30 Pueden usarse plantas adicionales así como sistemas de expresión no vegetales. La elección de la especie vegetal se determina principalmente por el uso pretendido de la planta o partes de la misma y la susceptibilidad de la especie vegetal a transformación.
- 35 Están disponibles varias técnicas para la introducción de la construcción de expresión que contiene la secuencia de ADN que codifica fitasa en las plantas diana. Se conocen bien técnicas para transformar una amplia diversidad de especies vegetales superiores y se describen en la bibliografía técnica y científica. Véase, por ejemplo, Weising (1988) *Ann. Rev. Genet.* 22: 421-477; Patente de Estados Unidos N° 5.750.870. Dichas técnicas también pueden incluir pero sin limitación transformación de protoplastos usando el método de calcio/polietilenglicol, electroporación y microinyección o bombardeo de partículas (recubiertas) (Potrykus, 1990). Además de estos llamados métodos de transformación de ADN directos, están ampliamente disponibles sistemas de transformación que implican vectores, tales como vectores virales (por ejemplo del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV) y vectores bacterianos (por ejemplo del género *Agrobacterium*) (Potrykus, 1990). Después de selección y/o exploración, los protoplastos, células o partes de plantas que se han transformado pueden regenerarse en plantas completas, usando métodos conocidos en la técnica (Horsch *et al.*, 1985). La elección de las técnicas de transformación y/o regeneración no es crítica.
- 40
- 45 Pueden introducirse ácidos nucleicos y construcciones de expresión de la invención en una célula vegetal por cualquier medio. El término "introducir" en el contexto de un polinucleótido, por ejemplo, una construcción de nucleótidos de interés, signifique presentar a la planta el polinucleótido de tal manera que el polinucleótido consiga acceder al interior de una célula de la planta. Cuando debe introducirse más de un polinucleótido, estos polinucleótidos pueden ensamblarse como parte de una construcción de nucleótidos individual, o como construcciones de nucleótidos separadas, y pueden localizarse en el mismo o diferentes vectores de transformación. En consecuencia, estos polinucleótidos pueden introducirse en la célula hospedadora de interés en un único acontecimiento de transformación, en acontecimientos de transformación separados o, por ejemplo, en plantas, como parte de un protocolo de cultivo. No hay dependencia de un método particular para introducir uno o más polinucleótidos en una planta, solamente que el polinucleótido o los polinucleótidos consigan acceder al interior de al menos una célula de la planta. Se conocen en la técnica métodos para introducir polinucleótidos en plantas incluyendo, pero sin limitación, métodos de transformación transitorios, métodos de transformación estables y métodos mediados por virus.
- 50
- 55 Puede usarse "transformación transitoria", y en el contexto de un polinucleótido se pretende que signifique que un polinucleótido se introduce en la planta y no se integra en el genoma de la planta. Puede usarse "introducir de forma estable" o "introducido de forma estable" en el contexto de un polinucleótido introducido en una planta, y en algunos aspectos se pretende que el polinucleótido introducido se incorpore de forma estable en el genoma de la planta, y de este modo la planta se transforme de forma estable con el polinucleótido.
- 60
- 65 Puede usarse "transformación estable" o "transformado de forma estable" en el contexto de un polinucleótido

introducido en una planta, y en algunos aspectos se pretende que se introduzca un polinucleótido, por ejemplo, una construcción de nucleótidos descrita en el presente documento, en una planta, se integre en el genoma de la planta y sea capaz de heredarse por la descendencia de la misma, más particularmente por la descendencia de múltiples generaciones sucesivas. La introducción en el genoma de una planta deseada puede ser tal que la enzima se regule por elementos de control de la transcripción o la traducción endógenos. Se conocen bien en este campo técnicas de transformación tanto para monocotiledóneas como para dicotiledóneas.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden usarse para conferir rasgos deseados en esencialmente cualquier planta. La enzima de la invención puede expresarse de tal modo que la enzima no entre en contacto con su sustrato hasta que se desee. Por ejemplo, una enzima de la invención puede dirigirse y retenerse en el retículo endoplásmico de una célula vegetal. La retención de la enzima, en el retículo endoplásmico de la célula, evitará que la enzima entre en contacto con su sustrato. La enzima y el sustrato pueden después ponerse en contacto mediante cualquier medio que pueda alterar la arquitectura subcelular, tal como, pulverización, molienda, calentamiento y similares. Véase documentos WO 98/11235, WO 2003/18766 y WO 2005/096704.

Pueden añadirse genes marcadores seleccionables a la construcción génica para identificar células vegetales o tejidos que han integrado con éxito el transgén. Esto puede ser necesario porque la consecución de la incorporación y expresión de genes en células vegetales es un acontecimiento poco común, que se produce en solamente un porcentaje bajo de los tejidos o células diana. Los genes marcadores seleccionables codifican proteínas que proporcionan resistencia a agentes que normalmente son tóxicos para las plantas, tales como antibióticos o herbicidas. Solo las células vegetales que han integrado el gen marcador seleccionable sobrevivirán cuando se cultiven en un medio que contenga el antibiótico o herbicida apropiado. Los marcadores de selección usados de forma rutinaria en la transformación incluyen el gen de nptII, que confiere resistencia a kanamicina y antibióticos relacionados (Messing & Vierra. *Gene* 19: 259-268 (1982); Bevan *et al.*, *Nature* 304: 184-187 (1983)), el gen bar que confiere resistencia al herbicida fosfinotricina (White *et al.*, *Nucl. Acids Res* 18: 1062 (1990), Spencer *et al.* *Theor. Appl. Genet* 79: 625-631 (1990)), el gen hph, que confiere resistencia al antibiótico higromicina (Blochinger & Diggelmann, *Mol Cell Biol* 4: 2929-2931), el gen dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Bourouis *et al.*, *EMBO J.* 2(7): 1099-1104 (1983)), el gen EPSPS, que confiere resistencia a glifosato (Patentes de Estados Unidos N° 4.940.935 y 5.188.642).

Como alternativa, puede identificarse material vegetal transgénico mediante un sistema de selección positivo, tal como el sistema que utiliza el gen de la manosa-6-fosfato isomerasa, que proporciona la capacidad para metabolizar manosa (Patentes de Estados Unidos N° 5.767.378 y 5.994.629).

Realizar plantas o semillas transgénicas puede comprender incorporar secuencias de la invención y, opcionalmente, genes marcadores en una construcción de expresión diana (por ejemplo, un plásmido) junto con posicionamiento del promotor y las secuencias terminadoras. Esto puede implicar transferir el gen modificado a la planta mediante un método adecuado. Una o más de las secuencias de la invención pueden combinarse con secuencias que confieran resistencia a insectos, enfermedad, sequía, aumentan el rendimiento, mejoran la calidad nutricional del grano, mejoran el rendimiento de etanol y similares.

Por ejemplo, puede introducirse una construcción directamente en el ADN genómico de la célula vegetal usando técnicas tales como electroporación y microinyección de protoplastos de células vegetales, o las construcciones pueden introducirse directamente en tejido vegetal usando métodos balísticos, tales como bombardeo de partículas de ADN. Por ejemplo, véase, por ejemplo, Christou (1997) *Plant Mol. Biol.* 35: 197-203; Pawlowski (1996) *Mol. Biotechnol.* 6: 17-30; Klein (1987) *Nature* 327: 70-73; Takumi (1997) *Genes Genet. Syst.* 72: 63-69, que analizan el uso del bombardeo de partículas para introducir transgenes en trigo; y Adam (1997) mencionado anteriormente, para uso del bombardeo de partículas para introducir YAC en células vegetales. Por ejemplo, Rinehart (1997) mencionado anteriormente, usó bombardeo de partículas para generar plantas de algodón transgénicas. Se describen aparatos para acelerar partículas en la Patente de Estados Unidos N° 5.015.580 y el instrumento de aceleración de partículas disponible en el mercado BioRad (Biolistics) PDS-2000; véase también, John, Patente de Estados Unidos N° 5.608.148; y Ellis, Patente de Estados Unidos N° 5.681.730, que describe transformación mediada por partículas de gimnospermas.

Los protoplastos pueden inmovilizarse e inyectarse con un ácido nucleico, por ejemplo, una construcción de expresión. Aunque la regeneración de plantas a partir de protoplastos no es fácil con cereales, la regeneración de plantas es posible en legumbres usando embriogénesis somática a partir de callos derivados de protoplastos. Los tejidos organizados pueden transformarse con ADN desnudo usando la técnica de pistola génica, donde el ADN se usa para recubrir microproyectiles de tungsteno, se disparan a 1/100 del tamaño de las células, que transportan el ADN en profundidad a las células y orgánulos. Después se induce que el tejido transformado se regenere, habitualmente por embriogénesis somática. Esta técnica ha sido exitosa en varias especies de cereales incluyendo maíz y arroz.

También pueden introducirse ácidos nucleicos, por ejemplo, construcciones de expresión en células vegetales usando virus recombinantes. Pueden transformarse células vegetales usando vectores virales, tales como, por ejemplo, vectores derivados del virus del mosaico del tabaco (Rouwendal (1997) *Plant Mol. Biol.* 33: 989-999), véase

Porta (1996) "Use of viral replicons for the expression of genes in plants", Mol. Biotechnol. 5: 209-221.

Como alternativa, pueden combinarse ácidos nucleicos, por ejemplo, una construcción de la expresión, con regiones flanqueantes de ADN-T adecuadas e introducirse en un vector hospedador de *Agrobacterium tumefaciens* convencional. Las funciones de virulencia del hospedador *Agrobacterium tumefaciens* dirigirán la inserción de la construcción y marcador adyacente al ADN de la célula vegetal cuando la célula se infecte por las bacterias. Se describen bien en la bibliografía científica técnicas de transformación mediadas por *Agrobacterium tumefaciens*, incluyendo desarme y uso de vectores binarios. Véase, por ejemplo, Horsch (1984) Science 233: 496-498; Fraley (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 4803 (1983); Gene Transfer to Plants, Potrykus, ed. (Springerlag, Berlín 1995). El ADN en una célula de *A. tumefaciens* está contenido en el cromosoma bacteriano así como en otra estructura conocida como un plásmido Ti (inductor de tumores). El plásmido Ti contiene un tramo de ADN denominado ADN-T (-20 kb de longitud) que se transfiere a la célula vegetal en el proceso de infección y una serie de genes vir (virulencia) que dirigen el proceso de infección. *A. tumefaciens* puede infectar solamente una planta a través de las heridas; cuando una raíz o tallo de la planta está herido emite ciertas señales químicas, en respuesta a las cuales los genes vir de *A. tumefaciens* se activan y dirigen una serie de acontecimientos necesarios para la transferencia del ADN-T del plásmido Ti al cromosoma de la planta. El ADN-T entra después en la célula vegetal a través de la herida. Una especulación es que el ADN-T espera hasta que el ADN de la planta está replicándose o transcribiéndose, después se inserta en el ADN vegetal expuesto. Para usar *A. tumefaciens* como un vector transgénico, hay que retirar la sección inductora de tumores de ADN-T, conservando a la vez las regiones de los extremos del ADN-T y los genes vir. El transgén se inserta después entre las regiones de los extremos del ADN-T, donde se transfiere a la célula vegetal y se integra en los cromosomas de la planta.

Las plantas monocotiledóneas pueden transformarse usando los ácidos nucleicos de la invención, incluyendo cereales importantes, véase Hiei (1997) Plant Mol. Biol. 35: 205-218. Véase también, por ejemplo, Horsch, Science (1984) 233: 496; Fraley (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 4803; Thykjaer (1997) mencionado anteriormente; Park (1996) Plant Mol. Biol. 32: 1135-1148, que analizan la integración de ADN-T en ADN genómico. Véase también D'Halluin, Patente de Estados Unidos N° 5.712.135, que describe un proceso para la integración estable de un ADN que comprende un gen que es funcional en una célula de un cereal, u otra planta monocotiledónea.

La tercera etapa puede implicar la selección y regeneración de plantas completas capaces de transmitir el gen diana incorporado a la siguiente generación. Dichas técnicas de regeneración se basan en la manipulación de ciertas fitohormonas en un medio de crecimiento de cultivo tisular, que se basa típicamente en un marcador biocida y/o herbicida que se ha introducido junto con las secuencias de nucleótidos deseadas. Se describe regeneración de plantas a partir de protoplasts de cultivo en Evans *et al.*, Protoplasts Isolation and Culture, Handbook of Plant Cell Culture, pp. 124-176, MacMillan Publishing Company, Nueva York, 1983; y Binding, Regeneration of Plants, Plant Protoplasts, pp. 21-73, CRC Press, Boca Raton, 1985. La regeneración también puede obtenerse de callos vegetales, explantes, órganos o partes de los mismos. Dichas técnicas de regeneración se describen de forma general en Klee (1987) Ann. Rev. of Plant Phys. 38: 467-486. Para obtener plantas completas de tejidos transgénicos tales como embriones inmaduros, pueden cultivarse en condiciones ambientales controladas en una serie de medios que contienen nutrientes y hormonas, un proceso conocido como cultivo tisular. Una vez que se generan plantas completas y producen semillas, comienza la evaluación de la descendencia.

Después de incorporarse de forma estable el casete de expresión en plantas transgénicas, puede introducirse en otras plantas por cruce sexual. Puede usarse cualquiera de varias técnicas de cultivo convencionales, dependiendo de la especie para cruzar. Véase, por ejemplo, Welsh J. R., Fundamentals of Plant Genetics and Breeding, John Wiley & Sons, NY (1981); Crop Breeding, Wood D. R. (Ed.) American Society of Agronomy Madison, Wis. (1983); Mayo O., The Theory of Plant Breeding, Segunda Edición, Clarendon Press, Oxford (1987); Singh, D. P., Breeding for Resistance to Diseases and Insect Pests, Springer-Verlag, NY (1986); y Wricke y Weber, Quantitative Genetics and Selection Plant Breeding, Walter de Gruyter and Co., Berlín (1986).

Puesto que la expresión transgénica de los ácidos nucleicos de la invención conduce a cambios fenotípicos, las plantas que comprenden los ácidos nucleicos recombinantes de la invención pueden cruzarse sexualmente con una segunda planta para obtener un producto final. Por lo tanto, la semilla puede derivar de un cruce entre dos plantas transgénicas que se desvelan en el presente documento, o de un cruce entre una tal planta y otra planta. Los efectos deseados (por ejemplo, expresión de los polipéptidos de la invención para producir una planta en la que el comportamiento de floración está alterado) pueden potenciarse cuando ambas plantas parentales expresan los polipéptidos (por ejemplo, fitasa) de la invención. Los efectos deseados pueden pasarse a generaciones vegetales futuras por medios de propagación convencionales.

Para dicotiledóneas, puede usarse un sistema de vectores binario (Hoekema *et al.*, 1983; documento EP 0120516 Schilperoort *et al.*). Por ejemplo, pueden usarse cepas de *Agrobacterium* que contienen un plásmido vir con los genes de virulencia y un plásmido compatible que contiene la construcción génica para transferir. Este vector puede replicarse tanto en *E. coli* como en *Agrobacterium*, y deriva del vector binario Bin19 (Bevan, 1984) que está alterado en detalles que no son relevantes para la presente invención. Los vectores binarios como se usan en el presente ejemplo contienen entre las secuencias de los extremos izquierdo y derecho del ADN-T, un gen NPTII idéntico que codifica resistencia a kanamicina (Bevan, 1984) y un sitio de clonación múltiple para clonar en las construcciones

génicas requeridas.

La transformación y regeneración de cultivos monocotiledóneos puede practicarse usando cualquier método o procedimiento convencional; las monocotiledóneas son susceptibles de transformación y las plantas transgénicas fértiles pueden regenerarse a partir de células transformadas. En un aspecto alternativo, las monocotiledóneas se transforman por transformación con *Agrobacterium*.

Pueden obtenerse plantas de arroz transgénico usando el gen hph bacteriano, que codifica resistencia a higromicina, como un marcador de selección; el gen puede introducirse por electroporación. Pueden obtenerse plantas de maíz transgénico introduciendo el gen de bar de *Streptomyces hygrosopicus*, que codifica fosfotricina acetiltransferasa (una enzima que inactiva el herbicida fosfotricina), en células embriogénicas de un cultivo de suspensión de maíz por bombardeo de micropartículas. Puede introducirse material genético en protoplastos de aleurona de cultivos de monocotiledóneas tales como trigo y cebada. Pueden regenerarse plantas de trigo de cultivo de suspensión embriogénica seleccionando solamente los tejidos de callos embriogénicos nodulares y compactos envejecidos para el establecimiento de los cultivos de suspensión embriogénicos. La combinación con sistemas de transformación para estos cultivos permite la aplicación a monocotiledóneas. Estos métodos y otros métodos también pueden aplicarse para la transformación y regeneración de dicotiledóneas.

La expresión de la construcción de fitasa puede implicar detalles tales como la transcripción del gen por polimerasas vegetales, traducción de ARNm, etc. que se conocen por personas expertas en la materia de las técnicas de ADN recombinante. Se analizan en el presente documento algunos detalles. Pueden usarse secuencias reguladoras que se sabe o se descubre que provocan expresión de fitasa. La elección de las secuencias reguladoras usadas puede depender del cultivo diana y/u órgano diana de interés. Dichas secuencias reguladoras pueden obtenerse de plantas o virus vegetales, o pueden sintetizarse químicamente. Dichas secuencias reguladoras son promotores activos en la dirección de la transcripción en plantas, bien constitutivamente o bien de forma específica de estadio y/o tejido, dependiendo del uso de la planta o partes de la misma. Estos promotores incluyen, pero sin limitación, promotores que muestran expresión constitutiva, tales como el promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV) (Guilley *et al.*, 1982), los de expresión específica de hojas, tales como el promotor del gen de la subunidad pequeña de ribulosa bisfosfato carboxilasa (Coruzzi *et al.*, 1984), los de expresión específica en raíces, tales como el promotor del gen de la glutamina sintasa (Tingey *et al.*, 1987), los de expresión específica de semilla, tales como el promotor de cruciferina A de *Brassica napus* (Ryan *et al.*, 1989), los de expresión específica de tubérculos, tales como el promotor de patatina de clase I de la patata (Koster-Topfer *et al.*, 1989; Wenzler *et al.*, 1989) o los de expresión específica de fruto, tales como el promotor de poligalacturonasa (PG) del tomate (Bird *et al.*, 1988).

Pueden usarse otras secuencias reguladoras tales como las secuencias terminadoras y señales de poliadenilación, y pueden incluir cualquiera de dichas secuencias que actúen como tal en plantas, la elección de la cual está dentro del nivel del experto en la materia. Un ejemplo de dichas secuencias es la región flanqueante 3' del gen de la nopalina sintasa (nos) de *Agrobacterium tumefaciens* (Bevan, mencionado anteriormente). Las secuencias reguladoras también pueden incluir secuencias potenciadoras, tales como las que se encuentran en el promotor 35S de CaMV y secuencias estabilizadoras de ARNm tales como la secuencia líder de RNA4 del Virus del Mosaico de la Alfalfa (AIMV) (Brederode *et al.*, 1980) o cualquier otra secuencia que actúe de una manera similar.

En algunas realizaciones, se expresa una fitasa de la invención en un ambiente que permita la estabilidad de la proteína expresada. La elección de compartimentos celulares, tales como citosol, retículo endoplásmico, vacuola, cuerpo proteico o espacio periplásmico puede usarse para crear dicho ambiente estable, dependiendo de los parámetros biofísicos de la fitasa. Dichos parámetros incluyen, pero sin limitación, pH óptimo, sensibilidad a proteasas o sensibilidad a la molaridad del compartimento preferido.

En algunas realizaciones, una fitasa de la invención se expresa en citoplasma; en algún aspecto, para obtener expresión en el citoplasma de la célula, la enzima expresada no debería contener un péptido señal secretor o cualquier otra secuencia diana. Para expresión en cloroplastos y mitocondrias la enzima expresada debería contener el llamado péptido de tránsito específico para importar en estos orgánulos. Se conocen secuencias de dirección que pueden unirse a la enzima de interés para conseguir esto (Smeekens *et al.*, 1990; van den Broeck *et al.*, 1985; Wolter *et al.*, 1988). Si la actividad de la enzima se desea en las vacuolas, tiene que estar presente un péptido señal secretor, así como una secuencia de dirección específica que dirija la enzima a estas vacuolas (Tague *et al.*, 1990). Los mismo es cierto para los cuerpos proteicos en las semillas. La secuencia de ADN que codifica la enzima de interés debería modificarse de tal modo que la enzima puede ejercer su acción en la localización deseada en la célula.

En algunas realizaciones, para conseguir la expresión extracelular de la fitasa, la construcción de la expresión de la presente invención utiliza una secuencia señal secretora. Aunque pueden preferirse secuencias señal que sean homólogas (nativas) de la especie hospedadora vegetal, también pueden usarse secuencias señal heterólogas, es decir las que se originan de otra especie vegetal o de origen microbiano. Dichas secuencias señal se conocen por los expertos en la materia. Se desvelan secuencias señal apropiadas que pueden usarse dentro del contexto de la presente invención en Blobel *et al.*, 1979; Von Heijne, 1986; Garcia *et al.*, 1987; Sijmons *et al.*, 1990; Ng *et al.*, 1994; y Powers *et al.*, 1996).

En algunas realizaciones, todas las partes de las construcciones de ADN relevantes (secuencias promotoras, reguladoras, secretoras, estabilizadoras, de dirección o de terminación) de la presente invención se modifican, si se desea, para afectar a sus características de control usando métodos conocidos por los expertos en la materia.

5 Pueden usarse plantas que contengan fitasa de la presente invención para obtener plantas u órganos vegetales con niveles de fitasa aún mayores. Por ejemplo, es posible obtener dichas plantas u órganos vegetales mediante el uso de técnicas de variación somaclonales o mediante técnicas de cruzamiento. Dichas técnicas se conocen bien por los expertos en la materia.

10 En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método (y productos del mismo) para conseguir un sistema de sobreexpresión altamente eficaz para fitasa y otras moléculas. La divulgación proporciona un método (y productos del mismo) para conseguir un sistema de sobreexpresión altamente eficaz para fitasa y fosfatasa ácida de pH 2,5 en *Trichoderma*. Este sistema da como resultado composiciones enzimáticas que tienen utilidad particular en la industria del pienso animal. Están en la bibliografía pública y/o se conocen por los expertos en la materia detalles
15 adicionales con respecto a este enfoque. En una ejemplificación no limitante particular, dicha bibliografía disponible públicamente incluye el documento EP 0659215 (W0 9403612 A1) (Nevalainen *et al.*), aunque estas referencias no ensañan las moléculas de la invención de la presente solicitud.

20 En algunas realizaciones, se usa redistribución *in vivo*, que puede centrarse en procesos "intermoleculares" denominados colectivamente "recombinación", que en las bacterias puede ser un fenómeno "dependiente de RecA". Esto puede basarse en procesos de recombinación de una célula hospedadora para recombinar y redistribuir secuencias, o la capacidad de las células para mediar en procesos reductores para disminuir la complejidad de las secuencias cuasi repetidas en la célula por delección. Este proceso de "redistribución reductora" sucede por un proceso independiente de RecA "intramolecular".

25 Por lo tanto, pueden generarse polinucleótidos variantes por el proceso de redistribución reductora. El método implica la generación de construcciones que contienen secuencias consecutivas (secuencias codificantes originales), su inserción en un vector apropiado, y su introducción posterior en una célula hospedadora apropiada. La redistribución de las identidades moleculares individuales se produce por procesos combinatorios entre las
30 secuencias consecutivas en la construcción que posee regiones de homología, o entre unidades cuasi repetidas. El proceso de redistribución recombina y/o reduce la complejidad y alcance de las secuencias repetidas, y da como resultado la producción de nuevas especies moleculares. Pueden aplicarse diversos tratamientos para potenciar la tasa de redistribución. Estos podrían incluir tratamiento con luz ultravioleta o productos químicos perjudiciales para el ADN, y/o el uso de líneas celulares hospedadoras que presentan niveles potenciados de "inestabilidad genética".
35 Por lo tanto el proceso de redistribución puede implicar recombinación homóloga o la propiedad natural de secuencias cuasi repetidas para dirigir su propia evolución.

Pueden usarse secuencias repetidas o "cuasi repetidas"; estas secuencias pueden desempeñar un papel en la inestabilidad genética. Las "cuasi repeticiones" son repeticiones que no se restringen a su estructura unitaria original.
40 Las unidades cuasi repetidas pueden presentarse como una serie de secuencias en una construcción; unidades consecutivas de secuencias similares. Una vez ligadas, las uniones entre las secuencias consecutivas se hacen esencialmente invisibles y la naturaleza cuasi repetitiva de la construcción resultante es ahora continua al nivel molecular. El proceso de delección que la célula realiza para reducir la complejidad de la construcción resultante actúa entre las secuencias cuasi repetidas. Las unidades cuasi repetidas proporcionan un repertorio prácticamente
45 ilimitado de moldes sobre los que pueden producirse acontecimientos de deslizamiento. Las construcciones que contienen las cuasi repeticiones proporcionan de este modo eficazmente suficiente elasticidad molecular de modo que pueden producirse acontecimientos de delección (y potencialmente inserción) prácticamente en cualquier lugar dentro de las unidades cuasi repetitivas.

50 Cuando las secuencias cuasi repetidas están ligadas todas en la misma orientación, por ejemplo de cabeza a cola o viceversa, la célula no puede distinguir unidades individuales. En consecuencia, el proceso reductor puede producirse en todas las secuencias. Por el contrario, cuando por ejemplo las unidades se presentan de cabeza a cabeza, en lugar de cabeza a cola, la inversión delinea los puntos finales de la unidad adyacente de modo que la formación de delección favorecerá la pérdida de unidades discretas. Por lo tanto, las secuencias pueden ser en la
55 misma orientación. La orientación aleatoria de secuencias cuasi repetidas dará como resultado la pérdida de eficacia de redistribución, mientras que la orientación uniforme de las secuencias ofrecerá la mayor eficacia. Sin embargo, aunque tener menos de las secuencias contiguas en la misma orientación reduce la eficacia, aún pueden proporcionar suficiente elasticidad para la recuperación eficaz de nuevas moléculas. Pueden realizarse construcciones con las secuencias cuasi repetidas en la misma orientación para permitir mayor eficacia.

60 Las secuencias pueden ensamblarse en una orientación de cabeza a cola usando cualquiera de una diversidad de métodos, incluyendo los siguientes:

(a) Pueden utilizarse cebadores que incluyen una cabeza poli-A y cola poli-T que cuando se hacen monocatenarios proporcionan orientación. Esto se consigue teniendo las primeras bases de los cebadores hechas de ARN y por lo tanto fácilmente retirables por RNasa H.

(b) Pueden utilizarse cebadores que incluyan sitios de escisión de restricción únicos. Se requerirían múltiples sitios, una batería de secuencias únicas, y etapas de síntesis y ligación repetidas.

(c) Las pocas bases internas del cebador pueden tiolarse y puede usarse una exonucleasa para producir moléculas con colas apropiadas.

5 En algunos aspectos, la recuperación de las secuencias redistribuidas se basa en la identificación de los vectores de clonación con un RI reducido. Las secuencias codificantes redistribuidas pueden después recuperarse por amplificación. Los productos se vuelven a clonar y se expresan. La recuperación de vectores de clonación con RI reducido puede efectuarse por:

- 10 1) El uso de vectores mantenidos solamente de forma estable cuando se reduce la complejidad de la construcción;
- 15 2) La recuperación física de vectores acortados por procedimientos físicos. En este caso, el vector de clonación se recupera usando procedimientos de aislamiento de plásmidos convencionales y se fracciona su tamaño en un gel de agarosa, o columna con un punto de corte de peso molecular bajo utilizando procedimientos convencionales;
- 20 3) La recuperación de vectores que contienen genes interrumpidos que puede seleccionarse cuando se reduce el tamaño del inserto; y
- 4) El uso de técnicas de selección directas con un vector de expresión y la selección apropiada.

Pueden usarse secuencias codificantes (por ejemplo, genes) de organismos relacionados, y pueden demostrar un alto grado de homología y codificar productos proteicos bastante diversos. Estos tipos de secuencias son particularmente útiles como cuasi repeticiones. Sin embargo, aunque los protocolos ejemplares analizados posteriormente demuestran la redistribución de secuencias codificantes originales casi idénticas (cuasi repeticiones), este proceso no se limita a dichas repeticiones casi idénticas.

Una vez formadas, las construcciones pueden fraccionarse o no en tamaño, en un gel de agarosa de acuerdo con protocolos publicados, insertarse en un vector de clonación, y transfectarse en una célula hospedadora apropiada. Las células se propagan después y se efectúa "redistribución reductora". La tasa del proceso de redistribución reductora puede estimularse por la introducción de daño de ADN si se desea. Si la reducción de RI está mediada por la formación de deleciones entre secuencias repetidas por un mecanismo "intramolecular", o mediada por acontecimientos de tipo recombinación mediante mecanismos "intermoleculares" es irrelevante. El resultado final es una redistribución de las moléculas en todas las posibles combinaciones.

Una etapa adicional puede ser explorar los miembros de la biblioteca del grupo redistribuido para identificar miembros de la biblioteca redistribuidos individuales que tienen la capacidad de unirse o interactuar de otro modo con, o catalizar una reacción particular (por ejemplo, tal como catalizar la hidrólisis de un fitato).

Los polipéptidos que se identifican de dichas bibliotecas pueden usarse para fines terapéuticos, de diagnóstico, de investigación y relacionados (por ejemplo catalizadores, solutos para aumentar la osmolaridad de una solución acuosa y similares) y/o pueden someterse a uno o más ciclos adicionales de redistribución y/o selección.

Antes de o durante la recombinación o redistribución, los polinucleótidos de la invención o polinucleótidos generados por el método descrito en el presente documento pueden someterse a agentes o procesos que promuevan la introducción de mutaciones en los polinucleótidos originales. La introducción de dichas mutaciones aumentaría la diversidad de polinucleótidos híbridos resultantes y polipéptidos codificados a partir de los mismos. Los agentes o procedimientos que promueven la mutagénesis pueden incluir, pero sin limitación: (+)-CC-1065, o un análogo sintético tal como (+)-CC-1065-(N3-Adenina) (véase Sun y Hurley, 1992); un aducto de 4'-fluoro-4-aminobifenilo N-acetilado o desacetilado capaz de inhibir la síntesis de ADN (véase, por ejemplo, van de Poll *et al.*, 1992); o un aducto de 4-aminobifenilo N-acetilado o desacetilado capaz de inhibir la síntesis de ADN (véase también, van de Poll *et al.*, 1992, pp. 751-758); cromo trivalente, una sal de cromo trivalente, un aducto de ADN de hidrocarburo aromático policíclico ("PAH") capaz de inhibir la replicación de ADN, tal como 7-bromometil-benz[a]antraceno ("BMA"), tris(2,3-dibromopropil)fosfato ("Tris-BP"), 1,2-dibromo-3-cloropropano ("DB-CP"), 2-bromoacroleína (2BA), benzo[a]piren-7,8-dihidrodiol-9-10-epóxido ("BPDE"), una sal halógena de platino(II), N-hidroxi-2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]-quinolina ("N-hidroxi-IQ"), y N-hidroxi-2-amino-1-metil-6-fenilimidazo [4,5-f]-piridina ("N-hidroxi-PhIP"). Un medio ejemplar para ralentizar o detener la amplificación por PCR consiste en luz UV (+)-CC-1065 y (+)-CC-1065-(N3-Adenina). Son medios particularmente abarcados los aductos de ADN o polinucleótidos que comprenden los aductos de ADN de los polinucleótidos o grupo de polinucleótidos, que pueden liberarse o retirarse por un procedimiento incluyendo calentar la solución que comprende los polinucleótidos antes de procesamiento adicional.

Pueden producirse proteínas recombinantes que tienen actividad biológica tratando una muestra que comprende polinucleótidos molde bicatenarios que codifican una proteína natural en condiciones que posibilitan la producción de polinucleótidos híbridos o redistribuidos.

Pueden usarse cebadores codónicos patentados (que contienen una secuencia degenerada N,N,G/T) para introducir

- mutaciones puntuales en un polinucleótido, para generar un conjunto de polipéptidos descendientes en los que se representa una serie completa de sustituciones de aminoácidos individuales en cada posición de aminoácido (mutagénesis saturada de sitio génico (GSSM)). Los oligos usados están comprendidos de forma contigua por una primera secuencia homóloga, una secuencia degenerada N,N,G/T, y opcionalmente una segunda secuencia homóloga. Los productos de traducción descendientes corriente abajo del uso de dichos oligonucleótidos incluyen todos los posibles cambios de aminoácidos en cada sitio de aminoácido a lo largo del polipéptido, debido a que la degeneración de la secuencia N,N,G/T incluye codones para los 20 aminoácidos.
- Puede usarse uno de dichos oligonucleótidos degenerados (que comprenden un casete N,N,G/T degenerado) para someter cada codón original en un molde polinucleotídico parental a una serie completa de sustituciones de codones. O, se usan al menos dos casetes N,N,G/T degenerados, bien en el mismo oligonucleótido o no, para someter al menos dos codones originales en un molde polinucleotídico parental a una serie completa de sustituciones de codones. Por lo tanto, puede contenerse más de una secuencia N,N,G/T en un oligonucleótido para introducir mutaciones de aminoácidos en más de un sitio. Esta pluralidad de secuencias N,N, G/T puede ser directamente contigua, o estar separada por una o más secuencias de nucleótidos adicionales. En otros aspectos, pueden usarse oligonucleótidos útiles para introducir adiciones y deleciones solas o en combinación con los codones que contienen una secuencia N,N,G/T, para introducir cualquier combinación o permutación de adiciones, deleciones y/o sustituciones de aminoácidos.
- Es posible mutar simultáneamente dos o más posiciones de aminoácidos contiguas usando un oligonucleótido que contenga tripletes de N,N,G/T contiguos, es decir una secuencia (N,N,G/T)_n degenerada.
- Pueden usarse casetes degenerados que tienen menos degeneración que la secuencia N,N,G/T. Por ejemplo, puede ser deseable en algunos casos usar (por ejemplo en un oligonucleótido) una secuencia de triplete degenerada que comprende solamente un N, donde dicho N puede estar en la primera, segunda o tercera posición del triplete. Puede usarse cualquier otra base incluyendo cualquier combinación y permutación de la misma en las dos posiciones restantes del triplete. Como alternativa, puede ser deseable en algunos casos usar (por ejemplo en un oligonucleótido) una secuencia de triplete N,N,N degenerada, o una secuencia de triplete N,N, G/C.
- Se aprecia, sin embargo, que el uso de un triplete degenerado (tal como N,N,G/T o una secuencia de triplete N,N, G/C) es ventajoso por varias razones. Esto proporciona un medio para generar sistemáticamente y de forma bastante fácil la sustitución de la serie completa de posibles aminoácidos (para un total de 20 aminoácidos) en todas y cada una de las posiciones de aminoácidos en un polipéptido. Por lo tanto, para un polipéptido de 100 aminoácidos, la invención proporciona un modo de generar sistemáticamente y de forma bastante fácil 2000 especies distintas (es decir, 20 posibles aminoácidos por posición por 100 posiciones de aminoácidos). Se aprecia que se proporciona, mediante el uso de un oligonucleótido que contiene una secuencia de triplete degenerada N,N,G/T o una N,N, G/C, 32 secuencias individuales que codifican 20 posibles aminoácidos. Por lo tanto, en un recipiente de reacción en el que se somete una secuencia polinucleotídica parental a mutagénesis por saturación usando uno de dichos oligonucleótidos, se generan 32 polinucleótidos descendientes distintos que codifican 20 polipéptidos distintos. Por el contrario, el uso de un oligonucleótido no degenerado en mutagénesis dirigida conduce a solamente un producto polipeptídico descendiente por recipiente de reacción.
- Pueden usarse oligonucleótidos no degenerados, opcionalmente en combinación con cebadores degenerados desvelados. Se aprecia que en algunas situaciones es provechoso usar oligonucleótidos no degenerados para generar mutaciones puntuales específicas en un polinucleótido de trabajo. Esto proporciona un medio para generar mutaciones puntuales silenciosas específicas, mutaciones puntuales que conducen a cambios de aminoácidos correspondientes y mutaciones puntuales que provocan la generación de codones de terminación y la expresión correspondiente de fragmentos polipeptídicos.
- Cada recipiente de reacción de mutagénesis por saturación puede contener polinucleótidos que codifican al menos 20 moléculas polipeptídicas descendientes de modo que los 20 aminoácidos están representados en la posición de aminoácido específica correspondiente a la posición de codón mutada en el polinucleótido parental. Los polipéptidos descendientes degenerados 32 veces de cada recipiente de reacción de mutagénesis por saturación pueden someterse a amplificación clonal (por ejemplo, clonarse en un hospedador de *E. coli* adecuado usando un vector de expresión) y someterse a exploración de la expresión. Cuando se identifica un polipéptido descendiente individual explorando para presentar un cambio favorable en una propiedad (cuando se compara con el polipéptido parental), se puede secuenciar para identificar la sustitución de aminoácido correspondientemente favorable contenida en el mismo.
- Se aprecia que tras mutar todas y cada una de las posiciones de aminoácidos en un polipéptido parental usando mutagénesis por saturación de sitio génico (GSSM) como se desvela en el presente documento, pueden identificarse cambios de aminoácidos favorables en más de una posición de aminoácido. Pueden generarse una o más moléculas descendientes nuevas que contienen una combinación de todas o parte de estas sustituciones de aminoácidos favorables. Por ejemplo, si se identifican 2 cambios de aminoácidos favorables específicos en cada una de 3 posiciones de aminoácidos en un polipéptido, las permutaciones incluyen 3 posibilidades en cada posición (sin cambios desde el aminoácido original, y cada uno de dos cambios favorables) y 3 posiciones. Por lo tanto, hay 3 x 3

x 3 o 27 posibilidades totales, incluyendo 7 que se han examinado previamente, 6 mutaciones puntuales individuales (es decir 2 en cada una de las tres posiciones) y ningún cambio en ninguna posición.

5 Puede usarse mutagénesis por saturación de sitio junto con redistribución, quimerización, recombinación y otros procesos de mutación, junto con exploración. Puede usarse cualquier proceso de mutación, incluyendo mutagénesis por saturación, por iteraciones. El uso por iteraciones de cualquier proceso de mutación puede usarse en combinación con la exploración.

10 Por lo tanto, en una ejemplificación no limitante, los polinucleótidos y polipéptidos de la invención pueden derivar por mutagénesis por saturación de sitio génico (GSSM) en combinación con procesos de mutación adicionales, tales como el proceso en el que se introducen dos o más polinucleótidos relacionados en una célula hospedadora adecuada de modo que se genere un polinucleótido híbrido por recombinación y redistribución reductora.

15 Además de realizar mutagénesis a lo largo de la secuencia completa de un gen, puede usarse mutagénesis para reemplazar cada una de cualquier variedad de bases en una secuencia polinucleotídica, donde el número de bases para mutar puede ser cada número entero de 15 a 100.000. Por lo tanto, en lugar de mutar cada posición a lo largo de una molécula, se puede someter cada una o un número discreto de bases (puede ser un subconjunto que suma de 15 a 100.000) a mutagénesis. Puede usarse un nucleótido separado para mutar cada posición o grupo de posiciones a lo largo de una secuencia polinucleotídica. Un grupo de tres posiciones para mutar puede ser un codón.
20 Las mutaciones pueden introducirse usando un cebador mutagénico, que contiene un casete heterólogo, también denominado un casete mutagénico. Los casetes ejemplares pueden tener de 1 a 500 bases. Cada posición de nucleótido en dichos casetes heterólogos son N, A, C, G, T, A/C, A/G, A/T, C/G, C/T, G/T, C/G/T, A/G/T, A/C/T, A/C/G o E, donde E es cualquier base que no sea A, C, G, o T (E puede denominarse oligonucleótido de diseño).

25 En un sentido general, la mutagénesis por saturación comprende mutar un conjunto completo de casetes mutagénicos (donde cada casete puede ser de aproximadamente 1-500 bases de longitud) en una secuencia polinucleotídica definida para mutar (donde la secuencia para mutar puede ser de aproximadamente 15 a 100.000 bases de longitud). Por lo tanto, se introduce un grupo de mutaciones (que varía de 1 a 100 mutaciones) en cada casete para mutar. Un agrupamiento de mutaciones para introducir en un casete puede ser diferente o el mismo de
30 un segundo agrupamiento de mutaciones para introducir en un segundo casete durante la aplicación de un ciclo de mutagénesis por saturación. Dichos agrupamiento se ejemplifican por deleciones, adiciones, agrupamientos de codones particulares, y agrupamientos de casetes de nucleótidos particulares.

35 Las secuencias definidas para mutar incluyen un gen completo, ruta, ADNc, una fase de lectura abierta completa (ORF) y el promotor completo, potenciador, represor/transactivador, origen de replicación, intrón, operador o cualquier grupo funcional polinucleotídico. Generalmente, una "secuencia definida" para este fin puede ser cualquier polinucleótido que tenga una secuencia polinucleotídica de 15 bases, y secuencias polinucleotídicas de longitudes entre 15 bases y 15.000 bases (nombrando específicamente cada número entero entre ellos). Las consideraciones en la elección de agrupamientos de codones incluyen tipos de aminoácidos codificados por un casete mutagénico
40 degenerado.

Un agrupamiento de mutaciones que pueden introducirse en un casete mutagénico, proporcionando específicamente sustituciones de codones degenerados (usando oligonucleótidos degenerados) que codifican 2, 3,
45 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20 aminoácidos en cada posición, y una biblioteca de polipéptidos codificados por los mismos.

En aspectos alternativos, los ácidos nucleicos de la invención comprenden ADN, incluyendo ADNc, ADN genómico y ADN sintético. El ADN puede ser bicatenario o monocatenario, y si es monocatenario puede ser la cadena
50 codificante o la no codificante (antisentido). Como alternativa, los ácidos nucleicos de la invención pueden comprender ARN.

Como se analiza en más detalle posteriormente, las secuencias de ácido nucleico aisladas de la invención pueden usarse para preparar los polipéptidos de la invención.

55 En consecuencia, otro aspecto de la invención es una secuencia de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido de la invención. Una secuencia de ácido nucleico de la invención puede comprender secuencias codificantes adicionales, tales como secuencias líder o secuencias de proproteínas y secuencias no codificantes, tales como intrones o secuencias no codificantes 5' y/o 3' de la secuencia codificante. Por lo tanto, como se usa en el presente documento, la expresión "polinucleótido que codifica un polipéptido" abarca un polinucleótido que incluye
60 solamente secuencia codificante para el polipéptido así como un polinucleótido que incluye secuencias codificantes y/o no codificantes adicionales.

Como alternativa, las secuencias de ácidos nucleicos de la invención pueden mutarse usando técnicas convencionales, tales como mutagénesis dirigida, u otras técnicas con las que están familiarizados los expertos en la
65 materia, para introducir cambios silenciosos en el polinucleótido de la invención. Como se usa en el presente documento, "cambios silenciosos" incluye, por ejemplo, cambios que no alteran la secuencia de aminoácidos

codificada por el polinucleótido. Dichos cambios pueden ser deseables para aumentar el nivel del polipéptido producido por células hospedadoras que contienen un vector que codifica el polipéptido introduciendo codones o pares de codones que aparecen frecuentemente en el organismo hospedador.

5 La invención también se refiere a polinucleótidos que tienen cambios de nucleótidos que dan como resultado sustituciones, adiciones, deleciones, fusiones y truncamientos de aminoácidos en los polipéptidos de la invención. Dichos cambios de nucleótidos pueden introducirse usando técnicas tales como mutagénesis dirigida, mutagénesis química aleatoria, deleción de exonucleasa III y otras técnicas de ADN recombinante.

10 Cuando sea necesario, pueden determinarse condiciones que permitan que la sonda hibride específicamente con secuencias complementarias colocando la sonda en contacto con secuencias complementarias de muestras que se sabe que contienen la secuencia complementaria así como secuencias de control que no contienen la secuencia complementaria. Las condiciones de hibridación, tales como la concentración salina del tampón de hibridación, la concentración de formamida del tampón de hibridación, o la temperatura de hibridación, pueden variarse para
15 identificar condiciones que permitan que la sonda hibride específicamente con ácidos nucleicos complementarios.

Si la muestra contiene el organismo del que se aisló el ácido nucleico, se detecta después hibridación específica de la sonda. La hibridación puede detectarse marcando la sonda con un agente detectable tal como un isótopo radiactivo, un colorante fluorescente o una enzima capaz de catalizar la formación de un producto detectable.
20

Los expertos en la materia están familiarizados con muchos métodos para usar las sondas marcadas para detectar la presencia de ácidos nucleicos complementarios en una muestra. Estos incluyen Transferencias de Southern, Transferencias de Northern, procedimientos de hibridación de colonias, y transferencias puntuales. Se proporcionan protocolos para cada uno de estos procedimientos en Ausubel *et al.* Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley 503 Sons, Inc. 1997 y Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
25

Como alternativa, puede usarse más de una sonda (al menos una de las cuales es capaz de hibridar específicamente con cualquier secuencia complementaria que esté presente en la muestra de ácido nucleico), en una reacción de amplificación para determinar si la muestra contiene un organismo que contiene una secuencia de ácido nucleico de la invención (por ejemplo, un organismo del que se aisló el ácido nucleico). Típicamente, las sondas comprenden oligonucleótidos. La reacción de amplificación puede comprender una reacción de PCR. Se describen protocolos de PCR en Ausubel y Sambrook, mencionado anteriormente. Como alternativa, la amplificación puede comprender una reacción en cadena de la ligasa, 3SR, o reacción de desplazamiento de cadena. (Véase Barany, F., "The Ligase Chain Reaction in a PCR World", PCR Methods and Applications 1:5-16, 1991; E. Fahy *et al.*, "Self-sustained Sequence Replication (3SR): An Isothermal Transcription-based Amplification System Alternative to PCR", PCR Methods and Applications 1: 25-33, 1991; y Walker G. T. *et al.*, "Strand Displacement Amplification-an Isothermal in vitro DNA Amplification Technique", Nucleic Acid Research 20: 1691-1696, 1992). En dichos procedimientos, los ácidos nucleicos en la muestra se ponen en contacto con las sondas, se realiza la reacción de
30 amplificación, y se detecta cualquier producto de amplificación resultante. El producto de amplificación puede detectarse realizando electroforesis en gel en los productos de reacción y tiñendo el gel con un intercalador tal como bromuro de etidio. Como alternativa, pueden marcarse una o más de las sondas con un isótopo radiactivo y puede detectarse la presencia de un producto de amplificación radiactivo por autorradiografía después de electroforesis en gel.
40

También pueden usarse sondas derivadas de secuencias cerca de los extremos de una secuencia de la invención en procedimientos de avance de cromosomas para identificar clones que contienen secuencias genómicas localizadas adyacentes a las secuencias de ácidos nucleicos como se ha expuesto anteriormente. Dichos métodos permiten el aislamiento de genes que codifican proteínas adicionales del organismo hospedador.
45

Puede usarse una secuencia de ácido nucleico de la invención como una sonda para identificar y aislar ácidos nucleicos relacionados. En algunos aspectos, los ácidos nucleicos relacionados pueden ser ADNc o ADN genómicos de organismos distintos del que se aisló el ácido nucleico. Por ejemplo, los otros organismos pueden ser organismos relacionados. En dichos procedimientos, se pone en contacto una muestra de ácido nucleico con la sonda en
50 condiciones que permitan a la sonda hibridar específicamente con secuencias relacionadas. La hibridación de la sonda con ácidos nucleicos del organismo relacionado se detecta después usando cualquiera de los métodos descritos anteriormente.

En reacciones de hibridación de ácido nucleico, las condiciones usadas para conseguir un nivel particular de rigurosidad variarán, dependiendo de la naturaleza de los ácidos nucleicos que se hibriden. Por ejemplo, la longitud, grado de complementariedad, composición de secuencia de nucleótidos (por ejemplo, contenido de GC frente a AT), y tipo de ácido nucleico (por ejemplo, ARN frente a ADN) de las regiones de hibridación de los ácidos nucleicos pueden tenerse en consideración al seleccionar las condiciones de hibridación. Una consideración adicional es si uno de los ácidos nucleicos está inmovilizado, por ejemplo, en un filtro.
60

La hibridación puede llevarse a cabo en condiciones de rigurosidad baja, rigurosidad moderada o rigurosidad alta.
65

Como ejemplo de hibridación de ácidos nucleicos, una membrana polimérica que contiene ácidos nucleicos desnaturizados inmovilizados se prehibrida en primer lugar durante 30 minutos a 45 °C en una solución que consiste en NaCl 0,9 M, NaH₂PO₄ 50 mM, pH 7,0, Na₂EDTA 5,0 mM, SDS al 0,5%, Denhardt 10X y ácido polirriboadenilico 0,5 mg/ml. Después se añaden aproximadamente 2 x 10⁷ cpm (actividad específica 4-9 x 10⁸ cpm/μg) de sonda oligonucleotídica marcada en el extremo con ³²P a la solución. Después de 12-16 horas de incubación, la membrana se lava durante 30 minutos a temperatura ambiente en SET 1X (NaCl 150 mM, Tris clorhidrato 20 mM, pH 7,8, Na₂EDTA 1 mM) que contiene SDS 0,5%, seguido de un lavado de 30 minutos en SET 1X nuevo a T_m-10 °C para la sonda oligonucleotídica. La membrana se expone después a película autorradiográfica para detección de señales de hibridación.

Variando la rigurosidad de las condiciones de hibridación usadas para identificar ácidos nucleicos, tales como ADNc o ADN genómicos, que hibridan con la sonda detectable, pueden identificarse y aislarse ácidos nucleicos que tienen niveles diferentes de homología con la sonda. La rigurosidad puede variarse realizando la hibridación a diversas temperaturas por debajo de las temperaturas de fusión de las sondas. La temperatura de fusión, T_m, es la temperatura (con fuerza iónica y pH definidos) a la que el 50% de la secuencia diana hibrida con una sonda perfectamente complementaria. Se seleccionan condiciones muy rigurosas para que sean iguales o aproximadamente 5 °C más bajas que la T_m para una sonda particular. La temperatura de fusión de la sonda puede calcularse usando las siguientes fórmulas: para sondas entre 14 y 70 nucleótidos de longitud la temperatura de fusión (T_m) se calcula usando la fórmula: $T_m = 81,5 + 16,6(\log [Na^+]) + 0,41(\text{fracción G+C}) - (600/N)$, donde N es la longitud de la sonda. Si la hibridación se lleva a cabo en una solución que contiene formamida, la temperatura de fusión puede calcularse usando la ecuación: $T_m = 81,5 + 16,6(\log [Na^+]) + 0,41(\text{fracción G+C}) - (\text{formamida al } 0,63\%) - (600/N)$, donde N es la longitud de la sonda. Puede llevarse a cabo prehibridación en SSC 6X, reactivo de Denhardt 5X, SDS 0,5%, ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturizado 100 μg/ml o SSC 6X, reactivos de Denhardt 5X, SDS 0,5%, ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturizado 100 μg/ml, formamida al 50%. Las fórmulas para las soluciones de Denhardt y SSC pueden encontrarse, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente.

Se realiza hibridación añadiendo la sonda detectable a las soluciones de prehibridación enumeradas anteriormente. Cuando la sonda comprende ADN bicatenario, se desnaturiza antes de la adición a la solución de hibridación. El filtro se pone en contacto con la solución de hibridación durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que la sonda hibride con ADNc o ADN genómicos que contienen secuencias complementarias de la misma u homólogos de la misma. Para sondas de más de 200 nucleótidos de longitud, la hibridación puede llevarse a cabo a 15-25 °C por debajo de la T_m. Para sondas más cortas, tales como sondas oligonucleotídicas, la hibridación puede realizarse a 5-10 °C por debajo de la T_m. Típicamente, para hibridaciones en SSC 6X, la hibridación se realiza a aproximadamente 68 °C. Habitualmente, para hibridaciones en soluciones que contienen formamida al 50%, la hibridación se realiza a aproximadamente 42 °C. Se considera que todas las hibridaciones anteriores están en condiciones de alta rigurosidad.

Tras la hibridación, se lava el filtro para retirar cualquier sonda detectable unida de forma no específica. La rigurosidad usada para lavar los filtros también puede variarse dependiendo de la naturaleza de los ácidos nucleicos que se hibriden, la longitud de los ácidos nucleicos que se hibriden, el grado de complementariedad, y la composición de secuencias de nucleótidos (por ejemplo, contenido de GC frente a AT) y el tipo de ácido nucleico (por ejemplo, ARN frente a ADN). Son ejemplos de lavados en condiciones de rigurosidad progresivamente mayor los siguientes: SSC 2X, SDS 0,1% a temperatura ambiente durante 15 minutos (rigurosidad baja); SSC 0,1X, SDS 0,5% a temperatura ambiente durante 30 minutos a 1 hora (rigurosidad moderada); SSC 0,1X, SDS 0,5% durante 15 a 30 minutos a entre la temperatura de hibridación y 68 °C (rigurosidad alta); y NaCl 0,15 M durante 15 minutos a 72 °C (rigurosidad muy alta). Puede realizarse un lavado de rigurosidad baja final en SSC 0,1X a temperatura ambiente. Los ejemplos anteriores son meramente ilustrativos de un conjunto de condiciones que pueden usarse para lavar filtros. Un experto en la materia conocerá que existen numerosas recetas para lavados de diferente rigurosidad. Se proporcionan a continuación algunos otros ejemplos.

Pueden identificarse ácidos nucleicos que han hibridado con la sonda mediante autorradiografía u otras técnicas convencionales.

El procedimiento anterior puede modificarse para identificar ácidos nucleicos que tengan niveles decrecientes de homología con la secuencia sonda. Por ejemplo, para obtener ácidos nucleicos de homología decreciente con la sonda detectable, pueden usarse condiciones menos rigurosas. Por ejemplo, la temperatura de hibridación puede reducirse en incrementos de 5 °C desde 68 °C a 42 °C en un tampón de hibridación que tenga una concentración de Na⁺ de aproximadamente 1 M. Después de la hibridación, el filtro puede lavarse con SSC 2X, SDS 0,5% a la temperatura de hibridación. Se considera que estas condiciones son condiciones "moderadas" por encima de 50 °C y condiciones "bajas" por debajo de 50 °C. Un ejemplo específico de condiciones de hibridación "moderadas" es cuando la hibridación anterior se realiza a 55 °C. Un ejemplo específico de condiciones de hibridación de "baja rigurosidad" es cuando la hibridación anterior se realiza a 45 °C.

Como alternativa, la hibridación puede llevarse a cabo en tampones, tales como SSC 6X, que contienen formamida a una temperatura de 42 °C. En este caso, la concentración de formamida en el tampón de hibridación puede

reducirse en incrementos de 5% del 50% al 0% para identificar clones que tengan niveles decrecientes de homología con la sonda. Después de la hibridación, el filtro puede lavarse con SSC 6X, SDS 0,5% a 50 °C. Se considera que estas condiciones son condiciones “moderadas” por encima de formamida al 25% y condiciones “bajas” por debajo de formamida al 25%. Un ejemplo específico de condiciones de hibridación “moderadas” es cuando la hibridación anterior se realiza a formamida al 30%. Un ejemplo específico de condiciones de hibridación de “rigurosidad baja” es cuando la hibridación anterior se realiza a formamida 10%.

Por ejemplo, los métodos anteriores pueden usarse para aislar ácidos nucleicos que tengan una secuencia con al menos aproximadamente 99%, al menos 98%, al menos 97%, al menos 95%, al menos 90% o al menos 80% de homología con una secuencia de ácido nucleico como se expone en SEC ID N°: 1, secuencias sustancialmente idénticas a la misma o fragmentos que comprenden al menos aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400 o 500 bases consecutivas de la misma, y las secuencias complementarias de cualquiera de las secuencias anteriores. La homología puede medirse usando un algoritmo de alineamiento. Por ejemplo, los polinucleótidos homólogos pueden tener una secuencia codificante que sea una variante alélica de origen natural de una de las secuencias codificantes descritas en el presente documento. Dichas variantes alélicas pueden tener una sustitución, delección o adición de uno o más nucleótidos en comparación con una secuencia de ácido nucleico como se expone en SEC ID N°: 1, o secuencias complementarias de la misma.

Adicionalmente, los procedimientos anteriores pueden usarse para aislar ácidos nucleicos que codifican polipéptidos que tienen al menos aproximadamente 99%, al menos 95%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80% o al menos 70% de homología con un polipéptido que tenga una secuencia como se expone en SEC ID N°: 2, secuencias sustancialmente idénticas a la misma, o fragmentos que comprenden al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100 o 150 aminoácidos consecutivos de la misma como se determina usando un algoritmo de alineamiento de secuencias (por ejemplo, tal como el algoritmo de FASTA versión 3.0t78 con los parámetros por defecto).

Los polipéptidos de la divulgación pueden obtenerse insertando un ácido nucleico que codifica el polipéptido en un vector de modo que la secuencia codificante está unida operativamente a una secuencia capaz de dirigir la expresión del polipéptido codificado en una célula hospedadora adecuada. Por ejemplo, el vector de expresión puede comprender un promotor, un sitio de unión a ribosomas para inicio de la traducción y un terminador de la transcripción. El vector también puede incluir secuencias apropiadas para amplificar la expresión.

Los promotores adecuados para expresar el polipéptido o fragmento del mismo en bacterias incluyen los promotores *lac* o *trp* de *E. coli*, el promotor *lacI*, el promotor *lacZ*, el promotor *T3*, el promotor *T7*, el promotor *gpt*, el promotor *lambda P_R*, el promotor *lambda P_L*, promotores de operones que codifican enzimas glicolíticas tales como 3-fosfoglicerato quinasa (PGK) y el promotor de la fosfatasa ácida. Los promotores fúngicos incluyen el promotor del factor ∇ . Los promotores eucariotas incluyen el promotor temprano inmediato de CMV, el promotor de timidina quinasa de HSV, los promotores de choque térmico, el promotor de SV40 temprano y tardío, las LTR de retrovirus, y el promotor de metalotioneína I de ratón. También pueden usarse otros promotores que se sabe que controlan la expresión de genes en células procariontas o eucariotas o sus virus.

Los vectores de expresión de mamíferos también pueden comprender un origen de replicación, cualquier sitio de unión a ribosoma necesario, un sitio de poliadenilación, sitios donadores y aceptores de corte y empalme, secuencias de terminación de la transcripción y secuencias no transcritas flanqueantes 5'. En algunos aspectos, pueden usarse secuencias de ADN derivadas de los sitios de corte y empalme y poliadenilación de SV40 para proporcionar los elementos genéticos no transcritos requeridos.

Los vectores para expresar el polipéptido o fragmento del mismo en células eucariotas también pueden contener potenciadores para aumentar los niveles de expresión. Los potenciadores son elementos de acción en cis del ADN, habitualmente de aproximadamente 10 a aproximadamente 300 pb de longitud que actúan en un promotor para aumentar su transcripción. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación pb 100 a 270, el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador del polioma en el lado tardío del origen de replicación y los potenciadores de adenovirus.

Además, los vectores de expresión típicamente contienen uno o más genes marcadores seleccionables para permitir la selección de células huésped que contienen el vector. Dichos marcadores de selección incluyen genes que codifican dihidrofolato reductasa o genes que confieren resistencia a neomicina para cultivo celular eucariotas, agentes que confieren resistencia a tetraciclina o ampicilina en *E. coli*, y el gen *TRP1* de *S. cerevisiae*.

El ADN sonda usado para aislar selectivamente el ADN diana de interés del ADN derivado de al menos un microorganismo puede ser una secuencia de región codificante de longitud completa o una secuencia de región codificante parcial de ADN para una enzima de actividad conocida. La biblioteca de ADN original puede explorarse usando mezclas de sondas que comprenden al menos una parte de la secuencia de ADN que codifica una enzima que tiene la actividad enzimática especificada. Estas sondas o bibliotecas de sondas pueden ser monocatenarias y el ADN microbiano que se explora puede convertirse en una forma monocatenaria. Las sondas que son adecuadas son las derivadas de ADN que codifica enzimas que tienen una actividad similar o idéntica a la actividad enzimática

específica que va a explorarse.

El ADN sonda puede ser de al menos aproximadamente 10 bases o al menos 15 bases. La región codificante completa puede emplearse como una sonda. Las condiciones para la hibridación en la que se aísla selectivamente ADN diana mediante el uso de al menos una sonda de ADN se diseñarán para proporcionar una rigurosidad de hibridación de al menos aproximadamente 50% de identidad de secuencia, más particularmente una rigurosidad que proporciona una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 70%.

El ADN sonda puede "marcarse" con un compañero de un par de unión específico (es decir un ligando) y el otro compañero del par se une a una matriz sólida para proporcionar facilidad de separación de la diana de su fuente. El ligando y el compañero de unión específico pueden seleccionarse de, en una de las orientaciones, los siguientes: (1) un antígeno o hapteno y un anticuerpo o fragmento de unión específico del mismo; (2) biotina o iminobiotina y avidina o estreptavidina; (3) un azúcar y una lectina específica para él; (4) una enzima y un inhibidor para ella; (5) una apoenzima y un cofactor; (6) oligonucleótidos homopoliméricos complementarios; y (7) una hormona y un receptor para ella. La fase sólida puede seleccionarse de: (1) un vidrio o superficie polimérica; (2) una columna empaquetada de perlas poliméricas; y (3) partículas magnéticas o paramagnéticas.

La secuencia de ADN apropiada puede insertarse en el vector por una diversidad de procedimientos. En general, la secuencia de ADN se liga a la posición deseada en el vector después de digestión del inserto y el vector con endonucleasas de restricción apropiadas. Como alternativa, pueden ligarse extremos romos tanto en el inserto como en el vector. Se desvela una diversidad de técnicas de clonación en Ausubel *et al.* Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley 503 Sons, Inc. 1997 y Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Se considera que dichos procedimientos y otros están dentro del alcance de los expertos en la materia.

El vector puede estar, por ejemplo, en forma de un plásmido, una partícula viral, o una fago. Otros vectores incluyen secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintético, derivados de SV40; plásmidos bacterianos, ADN de fago, baculovirus, plásmidos de levadura, vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fago, ADN viral tal como vaccinia, adenovirus, virus de viruela aviar y seudorrabia. Se describe una diversidad de vectores de clonación y expresión para su uso con huéspedes procariotas y eucariotas en Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor, N. Y., (1989).

Los vectores bacterianos particulares que pueden usarse incluyen los plásmidos disponibles en el mercado que comprenden elementos genéticos del vector de clonación bien conocido pBR322 (ATCC 37017), pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia), GEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA) pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen), pD10, psiX174 pBluescript II KS, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A (Stratagene), ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia), pKK232-8 y pCM7. Los vectores eucariotas particulares incluyen pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL (Pharmacia). Sin embargo, puede usarse cualquier otro vector siempre que sea replicable y viable en la célula hospedadora.

La célula hospedadora puede ser cualquiera de las células hospedadoras con las que están familiarizados los expertos en la materia, incluyendo células procariotas, células eucariotas, células de mamífero, células de insecto o células vegetales. Como ejemplos representativos de huéspedes apropiados, se pueden mencionar: células bacterianas, tales como *E. coli*, *Streptomyces*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* y diversas especies dentro de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Staphylococcus*, células fúngicas, tales como *Aspergillus*, levadura tal como cualquier especie de *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Schwanniomyces*, incluyendo *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* o *Schizosaccharomyces pombe*, células de insecto tales como *Drosophila S2* y *Spodoptera Sf9*, células animales tales como CHO, COS o melanoma de Bowes y adenovirus. La selección de un hospedador apropiado está dentro de las capacidades de los expertos en la materia.

El vector puede introducirse en las células hospedadoras usando cualquiera de una diversidad de técnicas, incluyendo transformación, transfección, transducción, infección viral, pistolas génicas o transferencia génica mediada por Ti. Los métodos particulares incluyen transfección por fosfato cálcico, transfección mediada por dextrano-DEAE, lipofección o electroporación (Davis, L., Dibner, M., Battey, I., Basic Methods in Molecular Biology, (1986)).

Cuando sea apropiado, las células hospedadoras modificadas por ingeniería genética pueden cultivarse en medio nutriente convencional modificado según sea apropiado para activar promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes de la invención. Después de la transformación de una cepa hospedadora adecuada y el cultivo de la cepa hospedadora a una densidad celular apropiada, el promotor seleccionado puede inducirse por medios apropiados (por ejemplo, cambio de temperatura o inducción química) y las células pueden cultivarse durante un periodo adicional para permitir que produzcan el polipéptido deseado o fragmento del mismo.

Las células se recogen típicamente por centrifugación, se rompen por medios físicos o químicos y el extracto en bruto resultante se conserva para purificación adicional. Las células microbianas empleadas para expresión de

- proteínas pueden romperse por cualquier método conveniente, incluyendo ciclos de congelación-descongelación, sonicación, rotura mecánica o uso de agentes de lisado celular. Dichos métodos se conocen bien por los expertos en la materia. El polipéptido expresado o fragmento del mismo puede recuperarse y purificarse de cultivos celulares recombinantes por métodos que incluyen precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción ácida, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxilapatita y cromatografía de lectina. Pueden usarse etapas de plegamiento proteico, según sea necesario, para completar la configuración del polipéptido. Si se desea, puede emplearse cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para las etapas de purificación finales. Pueden emplearse también diversos sistemas de cultivo celular de mamíferos para expresar proteína recombinante.
- Los ejemplos de sistemas de expresión de mamíferos incluyen las líneas COS-7 de fibroblastos de riñón de mono (descritas por Gluzman, Cell, 23: 175, 1981), y otras líneas celulares capaces de expresar proteínas de un vector compatible, tales como las líneas celulares C127, 3T3, CHO, HeLa y BHK.
- Las construcciones en células hospedadoras pueden usarse de una manera convencional para producir el producto génico codificado por la secuencia recombinante. Dependiendo del hospedador empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos producido por células hospedadoras que contienen el vector pueden estar glucosilados o pueden no estar glucosilados. Los polipéptidos de la invención también pueden incluir o no un resto de aminoácido metionina inicial. Están disponibles detalles adicionales en relación con la expresión recombinante de proteínas para los expertos en la materia. Por ejemplo, Protein Expression: A Practical Approach (Practical Approach Series de S. J. Higgins (Editor), B. D. Hames (Editor) (Julio de 1999) Oxford University Press; ISBN: 0199636249 proporciona directrices amplias para los expertos en la materia para la expresión de proteínas en una amplia diversidad de organismos.
- Como alternativa, los polipéptidos de la invención pueden producirse de forma sintética por sintetizadores peptídicos convencionales. En otros aspectos, los fragmentos o partes de los polipéptidos pueden emplearse para producir el polipéptido de longitud completa correspondiente por síntesis peptídica; por lo tanto, los fragmentos pueden emplearse como intermedios para producir los polipéptidos de longitud completa.
- Como se conoce por los expertos en la materia, las secuencias de ácido nucleico de la invención pueden optimizarse para expresión en una diversidad de organismos. En un aspecto, las secuencias de la invención se optimizan para uso codónico en un organismo de interés, por ejemplo, un hongo tal como *S. cerevisiae* o una bacteria tal como *E. coli*. Se entiende bien en la técnica que la optimización de secuencias de ácido nucleico para el fin de uso codónico se refiere a la selección de un codón particular favorecido por un organismo para codificar un aminoácido particular. Se conocen tablas de uso codónico optimizado para muchos organismos. Por ejemplo, véase Transfer RNA in Protein Synthesis by Dolph L. Hatfield, Byeong J. Lee, Robert M. Pirtle (Editor) (Julio de 1992) CRC Press; ISBN: 0849356989. Por lo tanto, la invención también incluye ácidos nucleicos de la invención adaptados para uso codónico de un organismo.
- La expresión optimizada de secuencias de ácido nucleico de la invención también se refiere a mutagénesis dirigida o aleatoria de un ácido nucleico para efectuar aumento de la expresión de la proteína codificada. La mutagénesis de los ácidos nucleicos de la invención puede proporcionar directa o indirectamente un aumento del rendimiento de la proteína expresada. Como ejemplo no limitante, pueden utilizarse técnicas de mutagénesis descritas en el presente documento para efectuar mutación de la región no traducida 5', región no traducida 3' o región codificante un ácido nucleico, cuya mutación puede dar como resultado aumento de la estabilidad al nivel de ARN o proteínas, dando como resultado de este modo un aumento de la producción de proteína.
- También pueden emplearse sistemas de traducción sin células para producir uno de los polipéptidos de la invención, usando ARNm transcritos de una construcción de ADN que comprende un promotor unido operativamente a un ácido nucleico que codifica el polipéptido o fragmento del mismo. En algunos aspectos, la construcción de ADN puede linealizarse antes de realizar una reacción de transcripción *in vitro*. El ARNm transcrito se incuba después con un extracto de traducción sin células apropiado, tal como un extracto de reticulocitos de conejo, para producir el polipéptido deseado o fragmento del mismo.
- La invención también se refiere a variantes de los polipéptidos de la invención. El término "variante" incluye derivados o análogos de estos polipéptidos. En particular, las variantes pueden diferir en su secuencia de aminoácidos de los polipéptidos de la invención, y secuencias sustancialmente idénticas a los mismos, en una o más sustituciones, adiciones, deleciones, fusiones y truncamientos, que pueden estar presentes en cualquier combinación.
- Las variantes pueden ser de origen natural o crearse *in vitro*. En particular, dichas variantes pueden crearse usando técnicas de ingeniería genética tales como mutagénesis dirigida, mutagénesis química aleatoria, procedimientos de deleción de Exonucleasa III y técnicas de clonación convencionales. Como alternativa, dichas variantes, fragmentos, análogos o derivados pueden crearse usando procedimientos de modificación o síntesis química.
- Los expertos en la materia también están familiarizados con otros métodos para realizar variantes. Estos incluyen procedimientos en los que se modifican secuencias de ácido nucleico obtenidas de aislados naturales para generar

ácidos nucleicos que codifican polipéptidos que tienen características que potencian su valor en aplicaciones industriales o de laboratorio. En dichos procedimientos, se generan y caracterizan una gran variedad de secuencias variantes que tienen una o más diferencias de nucleótidos con respecto a la secuencia obtenida del aislado natural. Típicamente, estas diferencias de nucleótidos dan como resultado cambios de aminoácidos con respecto a los polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos de los aislados naturales.

Por ejemplo, pueden crearse variantes usando PCR propensa a errores. En PCR propensa a errores, se realiza PCR en condiciones en las que la fidelidad de copia de la ADN polimerasa es baja, de modo que se obtenga una alta tasa de mutaciones puntuales a lo largo de la longitud completa del producto de PCR. Se describe PCR propensa a errores en Leung, D. W., *et al.*, *Technique*, 1: 11-15, (1989) y Caldwell, R. C. y Joyce G. F., *PCR Methods Applic.*, 2: 28-33, 1992. Brevemente, en dichos procedimientos, se mezclan ácidos nucleicos para mutar con cebadores de PCR, tampón de reacción, MgCl₂, MnCl₂, Taq polimerasa y una concentración apropiada de dNTP para conseguir una alta tasa de mutaciones puntuales a lo largo de la longitud completa del producto de PCR. Por ejemplo, la reacción puede realizarse usando 20 fmoles de ácido nucleico para mutar, 30 pmoles de cada cebador de PCR, un tampón de reacción que comprende KCl 50 mM, Tris HCl 10 mM (pH 8,3) y gelatina 0,01%, MgCl₂ 7 mM, MnCl₂ 0,5 mM, 5 unidades de Taq polimerasa, dGTP 0,2 mM, dATP 0,2 mM, dCTP 1 mM y dTTP 1 mM. Puede realizarse PCR durante 30 ciclos de 94 °C durante 1 minuto, 45 °C durante 1 minuto y 72 °C durante 1 minuto. Sin embargo, se apreciará que estos parámetros pueden variarse según sea apropiado. Los ácidos nucleicos mutados se clonan en un vector apropiado y se evalúan las actividades de los polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos mutados.

También pueden crearse variantes usando mutagénesis dirigida a oligonucleótidos para generar mutaciones específicas de sitio en cualquier ADN clonado de interés. Se describe mutagénesis de oligonucleótidos en Reidhaar-O'son, J. F. y Sauer, R. T., *et al.*, *Science*, 241: 53-57, 1988. Brevemente, en dichos procedimientos se sintetiza una pluralidad de oligonucleótidos bicatenarios que portan una o más mutaciones para introducir en el ADN clonado y se insertan en el ADN clonado para mutar. Se recuperan clones que contienen el ADN mutado y se evalúan las actividades de los polipéptidos que codifican.

Otro método para generar variantes es PCR de ensamblaje. La PCR de ensamblaje implica el ensamblaje de un producto de PCR a partir de una mezcla de fragmentos de ADN pequeños. Se realizan un gran número de reacciones de PCR diferentes en paralelo en el mismo vial, actuando los productos de una reacción como cebadores de los productos de la otra reacción. La PCR de ensamblaje se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Pendiente N° de Serie 08/677.112 presentada el 9 de julio de 1996, titulada *Method of "DNA Shuffling with Polynucleotides Produced by Blocking or interrupting a Synthesis or Amplification Process"*.

Otro método más para generar variantes es la mutagénesis por PCR sexual. En la mutagénesis por PCR sexual, se produce recombinación homóloga forzada entre moléculas de ADN de secuencia de ADN diferente pero altamente relacionada *in vitro*, como resultado de la fragmentación aleatoria de la molécula de ADN basada en homología de secuencia, seguido de fijación del cruzamiento por extensión de cebadores en una reacción de PCR. Se describe mutagénesis de PCR sexual en Stemmer, W. P., *PNAS, USA*, 91: 10747-10751, 1994. Brevemente, en dichos procedimientos se digiere una pluralidad de ácidos nucleicos para recombinar con DNasa para generar fragmentos que tengan un tamaño medio de 50-200 nucleótidos. Los fragmentos del tamaño medio deseado se purifican y se resuspenden en una mezcla de PCR. Se realiza PCR en condiciones que faciliten la recombinación entre los fragmentos de ácido nucleico. Por ejemplo, puede realizarse PCR resuspendiendo los fragmentos purificados a una concentración de 10-30 ng/:1 en una solución de 0,2 mM de cada dNTP, MgCl₂ 2,2 mM, KCl 50 mM, Tris HCl 10 mM, pH 9,0 y Triton X-100 0,1%. Se añaden 2,5 unidades de Taq polimerasa por 100:1 de mezcla de reacción y se realiza PCR usando el siguiente régimen: 94 °C durante 60 segundos, 94 °C durante 30 segundos, 50-55 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 30 segundos (30-45 veces) y 72 °C durante 5 minutos. Sin embargo, se apreciará que estos parámetros pueden variarse según sea apropiado. En algunos aspectos, pueden incluirse oligonucleótidos en las reacciones de PCR. En otros aspectos, puede usarse el fragmento de Klenow de la ADN polimerasa I en un primer conjunto de reacciones de PCR y puede usarse Taq polimerasa en un conjunto posterior de reacciones de PCR. Las secuencias recombinantes se aíslan y se evalúan las actividades de los polipéptidos que codifican.

También pueden crearse variantes mediante mutagénesis *in vivo*. En algunos aspectos, se generan mutaciones aleatorias en una secuencia de interés propagando la secuencia de interés en una cepa bacteriana, tal como una cepa de *E. coli*, que porta mutaciones en una o más de las rutas de reparación de ADN. Dichas cepas "mutantes" tienen una mayor tasa de mutación aleatoria que las de un parental natural. La propagación del ADN en una de estas cepas generará con el tiempo mutaciones aleatorias dentro del ADN. Se describen cepas mutantes adecuadas para su uso para mutagénesis *in vivo* en la Publicación de PCT N° WO 91/16427, publicada el 31 de octubre de 1991, titulada *"Methods for Phenotype Creation from Multiple Gene Populations"*.

También pueden generarse variantes usando mutagénesis de casete. En la mutagénesis de casete se reemplaza una región pequeña de una molécula de ADN bicatenaria con un "casete" oligonucleotídico sintético que difiere de la secuencia nativa. El oligonucleótido contiene con frecuencia secuencia nativa completa y/o parcialmente aleatoria.

También puede usarse mutagénesis de conjunto recursiva para generar variantes. La mutagénesis de conjunto

recursiva es un algoritmo para ingeniería proteica (mutagénesis proteica) desarrollada para producir poblaciones diversas de mutantes relacionados fenotípicamente cuyos miembros difieren en su secuencia de aminoácidos. Este método usa un mecanismo de retroalimentación para controlar rondas sucesivas de mutagénesis de casete combinatoria. La mutagénesis de conjunto recursiva se describe en Arkin, A. P. y Youvan, D. C., PNAS, USA, 89: 7811-7815, 1992.

En algunos aspectos, se crean variantes usando mutagénesis de conjunto exponencial. La mutagénesis de conjunto exponencial es un proceso para generar bibliotecas combinatorias con un alto porcentaje de mutantes únicos y funcionales, donde se seleccionan aleatoriamente grupos pequeños de restos en paralelo para identificar, en cada posición alterada, aminoácidos que conducen a proteínas funcionales. La mutagénesis de conjunto exponencial se describe en Delegrave, S. y Youvan, D. C., Biotechnol. Res., 11: 548-1552, 1993. Se describe mutagénesis aleatoria y dirigida en Arnold, F. H., Current Opinion in Biotechnology, 4: 450-455, 1993.

En algunos aspectos, las variantes se crean usando procedimientos de redistribución donde las partes de una pluralidad de ácidos nucleicos que codifican distintos polipéptidos se fusionan entre sí para crear secuencias de ácido nucleico quiméricas que codifican polipéptidos quiméricos como se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Pendiente N° de Serie 08/677.112 presentada el 9 de julio de 1996, titulada, "Method of DNA Shuffling with Polynucleotides Produced by Blocking or interrupting a Synthesis or Amplification Process", y la Solicitud de Patente de Estados Unidos Pendiente N° de Serie 08/651.568 presentada el 22 de mayo de 1996, titulada "Combinatorial Enzyme Development".

Las variantes de los polipéptidos de la invención pueden ser variantes en las que uno o más de los restos de aminoácidos de los polipéptidos de la invención se sustituyen con un resto de aminoácido conservado o no conservado (por ejemplo, un resto de aminoácido conservado) y dicho resto de aminoácido sustituido puede ser o no uno codificado por el código genético.

Son sustituciones conservativas las que sustituyen un aminoácido dado en un polipéptido por otro aminoácido de características similares. Son sustituciones típicamente vistas como conservativas los siguientes reemplazos: reemplazos de un aminoácido alifático tal como Ala, Val, Leu e Ile con otro aminoácido alifático; reemplazo de una Ser con un Thr o viceversa; reemplazo de un resto ácido tal como Asp y Glu con otro resto ácido; reemplazo de un resto que porta un grupo amida, tal como Asn y Gln, con otro resto que porta un grupo amida; intercambio de un resto básico tal como Lys y Arg con otro resto básico; y reemplazo de un resto aromático tal como Phe, Tyr con otro resto aromático.

Son otras variantes en las que uno o más de los restos de aminoácidos de los polipéptidos de la invención incluyen un grupo sustituyente.

Son otras variantes más en las que el polipéptido se asocia con otro compuesto, tal como un compuesto para aumentar la semivida del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol).

Son variantes adicionales en las que se fusionan aminoácidos adicionales con el polipéptido, tal como una secuencia líder, una secuencia secretora, una secuencia de proproteína o una secuencia que facilita la purificación, el enriquecimiento o la estabilización del polipéptido. En algunos aspectos, los derivados y análogos conservan la misma función o actividad biológica que los polipéptidos de la invención, y pueden incluir una proproteína, de modo que el fragmento, derivado o análogo pueda activarse por escisión de la parte de proproteína para producir un polipéptido activo.

Optimizar codones para conseguir altos niveles de expresión proteica en células hospedadoras

Los métodos para modificar ácidos nucleicos que codifican fitasa para modificar el uso codónico pueden aumentar o reducir su expresión en una célula hospedadora. El método comprende identificar un codón "no preferido" o uno "menos preferido" en ácido nucleico que codifica fitasa y reemplazar uno o más de estos codones no preferidos o menos preferidos con un "codón preferido" que codifica el mismo aminoácido que el codón reemplazado y al menos un codón no preferido o menos preferido en el ácido nucleico se ha reemplazado por un codón preferido que codifica el mismo aminoácido. Un codón preferido es un codón sobrerrepresentado en secuencias codificantes en genes en la célula hospedadora y un codón no preferido o menos preferido es un codón infrarrepresentado en secuencias codificantes en genes en la célula hospedadora.

Las células hospedadoras para expresar los ácidos nucleicos, casetes de expresión y vectores de la invención incluyen bacterias, levadura, hongos, células vegetales, células de insecto y células de mamífero. Las células hospedadoras ejemplares incluyen bacterias gram negativas, tales como *Escherichia coli* y *Pseudomonas fluorescens*; bacterias gram positivas, tales como *Lactobacillus gasseri*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*, *Bacillus subtilis*. Las células hospedadoras ejemplares también incluyen organismos eucariotas, por ejemplo, diversas levaduras, tales como *Saccharomyces* sp., incluyendo *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris* y *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, *Aspergillus niger*, y células y líneas celulares de mamífero y células y líneas celulares de insecto.

Por ejemplo, los codones de un ácido nucleico que codifica una fitasa aislada de una célula bacteriana se modifican de modo que el ácido nucleico se exprese de forma óptima en una célula bacteriana diferente de la bacteria de la que derivó la fitasa, una levadura, un hongo, una célula vegetal, una célula de insecto o una célula de mamífero. Se conocen bien en la técnica métodos para optimizar codones, véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.795.737; Baca (2000) *Int. J. Parasitol.* 30: 113-118; Hale (1998) *Protein Expr. Purif.* 12: 185-188; Narum (2001) *Infect. Immun.* 69: 7250-7253. Véase también Narum (2001) *Infect. Immun.* 69: 7250-7253, que describe optimización de codones en sistemas de ratón; Outchkourov (2002) *Protein Expr. Purif.* 24: 18-24, que describe optimización de codones en levadura; Feng (2000) *Biochemistry* 39: 15399-15409, que describe optimización de codones en *E. coli*; Humphreys (2000) *Protein Expr. Purif.* 20: 252-264, que describe optimización de uso codónico que afecta a la secreción en *E. coli*.

Animales no humanos transgénicos

Los animales no humanos transgénicos pueden comprender un ácido nucleico, un polipéptido, un casete de expresión o vector o una célula transfectada o transformada de la invención. Los animales no humanos transgénicos pueden ser, por ejemplo, cabras, conejos, ovejas, cerdos, vacas, ratas y ratones, que comprenden los ácidos nucleicos de la invención. Estos animales pueden usarse, por ejemplo, como modelos *in vivo* para estudiar la actividad fitasa, o como modelos para explorar con respecto a moduladores de la actividad fitasa *in vivo*. Las secuencias codificantes de los polipéptidos para expresar en los animales no humanos transgénicos pueden diseñarse para que sean constitutivas, o estén bajo el control de factores de regulación transcripcional específicos de tejido, específicos del desarrollo o inducibles. Los animales no humanos transgénicos pueden diseñarse y generarse usando cualquier método conocido en la técnica; véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 6.211.428; 6.187.992; 6.156.952; 6.118.044; 6.111.166; 6.107.541; 5.959.171; 5.922.854; 5.892.070; 5.880.327; 5.891.698; 5.639.940; 5.573.933; 5.387.742; 5.087.571, que describen la preparación y uso de células y óvulos transformados y ratones, ratas, conejos, ovejas, cerdos y vacas transgénicos. Véase también, por ejemplo, Pollock (1999) *J. Immunol. Methods* 231: 147-157, que describe la producción de proteínas recombinantes en la leche de animales de lechería transgénicos; Baguisi (1999) *Nat. Biotechnol.* 17: 456-461, que demuestra la producción de cabras transgénicas. La Patente de Estados Unidos N° 6.211.428 describe la preparación y uso de mamíferos no humanos transgénicos que expresan en sus cerebros una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de ADN. La Patente de Estados Unidos N° 5.387.742 describe la inyección de secuencias de ADN recombinantes o sintéticas clonadas en óvulos de ratón fertilizados, la implantación de los óvulos inyectados en hembras pseudoembarazadas, y el crecimiento hasta el parto de ratones transgénicos cuyas células expresan proteínas relacionadas con la patología de la enfermedad de Alzheimer. La Patente de Estados Unidos N° 6.187.992 describe la preparación y uso de un ratón transgénico cuyo genoma comprende una alteración del gen que codifica la proteína precursora amiloide (APP).

También pueden usarse "animales knockout". Por ejemplo, en un aspecto, los animales transgénicos o modificados comprenden un "animal knockout", por ejemplo, un "ratón knockout", modificado por ingeniería genética para no expresar o no ser capaz de expresar una fitasa.

Pueden proporcionarse organismos no humanos transgénicos que contienen una secuencia heteróloga que codifica una fitasa de la invención (por ejemplo, las modificaciones de secuencia enumeradas específicamente de SEC ID N°: 2). Pueden emplearse diversos métodos para preparar los animales transgénicos. Hablando en general, pueden emplearse tres de dichos métodos. En uno de dichos métodos, se recoge un embrión en el estadio pronuclear (un "embrión de una célula") de una hembra y el transgén se microinyecta en el embrión, en cuyo caso el transgén se integrará cromosómicamente tanto en las células germinales como en las células somáticas del animal maduro resultante. En otro de dichos métodos, se aíslan células madre embrionarias y el transgén se incorpora en las mismas por electroporación, transfección con plásmido o microinyección, seguido de reintroducción de las células madre en el embrión donde colonizan y contribuyen a la línea germinal. Se describen métodos para microinyección de especies de mamífero en la Patente de Estados Unidos N° 4.873.191.

En otro método ejemplar más, se infectan células embrionarias con un retrovirus que contiene el transgén por lo que las células germinales del embrión tienen el transgén integrado cromosómicamente en el mismo. Cuando los animales para hacer transgénicos son aviares, debido a que los óvulos fertilizados aviares generalmente experimentan división celular durante las primeras veinte horas en el oviducto, la microinyección en el pronúcleo del óvulo fertilizado es problemática debido a la inaccesibilidad del pronúcleo. Por lo tanto, de los métodos para preparar animales transgénicos descritos en general anteriormente, se prefiere la infección por retrovirus para especies aviares, por ejemplo como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.162.215. Si debe usarse microinyección con especies aviares, sin embargo, puede utilizarse un procedimiento publicado por Love *et al.*, (*Biotechnol.*, 12 de enero de 1994) por lo que el embrión se obtiene de una gallina sacrificada aproximadamente dos horas y media después de la puesta del huevo previamente puesto, el transgén se microinyecta en el citoplasma del disco germinal y el embrión se cultiva en una cáscara hospedadora hasta su madurez. Cuando los animales para hacer transgénicos son bovinos o porcinos, la microinyección puede obstaculizarse por la opacidad de los óvulos haciendo de este modo difícil identificar los núcleos por microscopía de contraste de interferencia diferencial tradicional. Para superar este problema, los óvulos pueden centrifugarse en primer lugar para segregar los

pronúcleos para una mejor visualización.

Los "animales no humanos" incluyen animales bovinos, porciones, ovinos y aviares (por ejemplo, vaca, cerdo, oveja, pollo). Los "animales no humanos transgénicos" se producen introduciendo "transgenes" en la línea germinal del animal no humano. Pueden usarse células diana embrionarias en diversos estadios del desarrollo para introducir transgenes. Se usan diferentes métodos dependiendo del estadio del desarrollo de la célula diana embrionaria. El cigoto es la mejor diana para la microinyección. El uso de cigotos como diana para transferencia génica tiene una ventaja importante porque en la mayoría de los casos el ADN inyectado se incorporará en el gen hospedador antes de la primera escisión (Brinster *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 4438-4442, 1985). Como consecuencia, todas las células del animal no humano transgénico portarán el transgén incorporado. Esto en general se verá reflejado en la transmisión eficaz del transgén a la descendencia del fundador puesto que el 50% de las células germinales albergarán el transgén.

El término "transgénico" se usa para describir un animal que incluye material genético exógeno dentro de todas sus células. Un animal "transgénico" puede producirse por cruzamiento de dos animales quiméricos que incluyen material genético exógeno dentro de las células usadas en reproducción. El veinticinco por ciento de la descendencia resultante será transgénica, es decir, animales que incluirán el material genético exógeno dentro de todas sus células en ambos alelos, el 50% de los animales resultantes incluirán el material genético exógeno dentro de un alelo y el 25% no incluirán material exógeno.

Puede usarse un método de microinyección. El transgén se digiere y se purifica de cualquier ADN de vector, por ejemplo, por electroforesis en gel. El transgén puede incluir un promotor asociado operativamente que interacciona con proteínas celulares implicadas en la transcripción, dando como resultado en última instancia expresión constitutiva. Los promotores útiles a este respecto incluyen los de citomegalovirus (CMV), virus de leucemia de Moloney (MLV) y virus del herpes, así como los de los genes que codifican metalotioneína, actina esquelética, P-enolpiruvato carboxilasa (PEPCK), fosfoglicerato (PGK), DHFR y timidina quinasa. También pueden emplearse promotores para repeticiones terminales largas (LTR) virales tales como Virus del Sarcoma de Rous. Cuando los animales para hacer transgénicos son aviares, los promotores preferidos pueden incluir los del gen de b-globina de pollo, gen de lisozima de pollo y virus de leucosis aviar. Las construcciones útiles en la transfección plasmídica de células madre embrionarias emplearán elementos reguladores adicionales bien conocidos en la técnica tales como elementos potenciadores para estimular la transcripción, aceptores de corte y empalme, señales de terminación y poliadenilación y sitios de unión a ribosomas para permitir la traducción.

También puede usarse infección retroviral para introducir el transgén en un animal no humano, como se ha descrito anteriormente. El embrión no humano en desarrollo puede cultivarse *in vitro* hasta el estadio de blastocisto. Durante este tiempo, los blastómeros pueden ser dianas para la infección retroviral (Jaenich, R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 1260-1264, 1976). Se obtiene infección eficaz de los blastómeros por tratamiento enzimático para retirar la zona pelúcida (Hogan, *et al.* (1986) en *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.). El sistema de vector viral usando para introducir el transgén es típicamente un retrovirus defectuoso en replicación que porta el transgén (Jahner, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6927-6931, 1985; Van der Putten, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6148-6152, 1985). La transfección se obtiene fácil y eficazmente cultivando los blastómeros en una monocapa de células productoras de virus (Van der Putten, mencionado anteriormente; Stewart, *et al.*, EMBO J. 6: 383-388, 1987). Como alternativa, puede realizarse infección en un estadio posterior. Puede inyectarse virus o células productoras de virus en el blastocele (D. Jahner *et al.*, Nature 298: 623-628, 1982). La mayoría de los fundadores serán mosaicos para el transgén puesto que la incorporación se produce solamente en un subconjunto de las células que formaban el animal no humano transgénico. Además, el fundador puede contener diversas inserciones retrovirales del transgén en diferentes posiciones en el genoma que generalmente se segregarán en la descendencia. Además, es posible también introducir transgenes en la línea germinal, aunque con baja eficacia, por infección retroviral intrauterina del embrión en mitad de la gestación (D. Jahner *et al.*, mencionado anteriormente).

Un tercer tipo de célula diana para la introducción de transgén es la célula madre embrionaria (ES). Las células ES se obtienen de embriones preimplantación cultivados *in vitro* y fusionados con embriones (M. J. Evans *et al.*, Nature 292: 154-156, 1981; M. O. Bradley *et al.*, Nature 309: 255-258, 1984; Gossler, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 9065-9069, 1986; y Robertson *et al.*, Nature 322: 445-448, 1986). Los transgenes pueden introducirse eficazmente en las células ES por transfección de ADN o por transducción mediada por retrovirus. Dichas células ES transformadas pueden a continuación combinarse con blastocistos de un animal no humano. Las células ES colonizan a continuación el embrión y contribuyen a la línea germinal del animal quimérico resultante (para una revisión véase Jaenisch, R., Science 240: 1468-1474, 1988).

"Transformada" significa una célula en la que (o en un ancestro de la que) se ha introducido, por medio de técnicas de ácido nucleico recombinante, una molécula de ácido nucleico heteróloga. "Heterólogo" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que se origina de otra especie o se modifica de su forma original o la forma expresada principalmente en la célula.

El "transgén" significa cualquier trozo de ADN que se inserta artificialmente en una célula, y se hace parte del

genoma del organismo (es decir, se integra de forma estable o como un elemento extracromosómico estable) que se desarrolla a partir de esa célula. Dicho transgén puede incluir un gen que es parcialmente o completamente heterólogo (es decir, ajeno) para el organismo transgénico, o puede representar un gen homólogo para un gen endógeno del organismo. Se incluye dentro de esta definición un transgén creado proporcionando una secuencia de ARN que se transcribe a ADN y se incorpora después en el genoma. Los transgenes de la divulgación incluyen secuencias de ADN que codifican fitasas o polipéptidos que tienen actividad fitasa, e incluyen polinucleótidos que pueden expresarse en un animal no humano transgénico. El término "transgénico" como se usa en el presente documento incluye adicionalmente cualquier organismo cuyo genoma se ha alterado por manipulación *in vitro* del embrión temprano u óvulo fertilizado o por cualquier tecnología transgénica para inducir una inactivación génica específica. El término "inactivación génica" como se usa en el presente documento, se refiere a la alteración dirigida de un gen *in vivo* con pérdida completa de función que se ha conseguido por cualquier tecnología transgénica con la que estén familiarizados los expertos en la materia. Son animales transgénicos que tienen inactivaciones génicas en los que el gen diana se ha hecho no funcional por una inserción dirigida al gen para hacerlo no funcional por recombinación homóloga.

El término "transgénico" incluye cualquier tecnología transgénica con la que estén familiarizados los expertos en la materia que pueda producir un organismo que porte un transgén introducido o uno en el que un gen endógeno se ha hecho no funcional o "inactivado".

El transgén para usar es una secuencia de ADN que comprende una secuencia que codifica una fitasa o un polipéptido que tiene actividad fitasa. Un polinucleótido que tenga una secuencia como se expone en SEC ID N°: 1 o una secuencia que codifique un polipéptido que tenga una secuencia como se expone en SEC ID N°: 2 puede ser el transgén como se define el término en el presente documento. Cuando sea apropiado, también pueden usarse en el presente documento secuencias de ADN que codifiquen proteínas que tengan actividad fitasa pero difieran en su secuencia de ácido nucleico debido a la degeneración del código genético, así como formas truncadas, variantes alélicas y homólogos entre especies.

Después de que un embrión se ha microinyectado, se ha colonizado con células madre embrionarias transfectadas o se ha infectado con un retrovirus que contiene el transgén (excepto en especies aviares que se aborda en otra parte de presente documento), el embrión se implanta en el oviducto de una hembra pseudoembarazada. La descendencia posterior se ensaya con respecto a incorporación del transgén por análisis de transferencia de Southern de sangre o muestras tisulares usando sondas específicas del transgén. La PCR es particularmente útil a este respecto. La descendencia positiva (G0) se cruza para producir descendencia (G1) que se analiza con respecto a expresión del transgén por análisis de transferencia de Northern de muestras tisulares.

Los métodos pueden comprender aumentar la captación de fósforo en el animal transgénico y/o reducir la cantidad de contaminante en el estiércol del organismo transgénico en aproximadamente 15%, aproximadamente 20% o aproximadamente 20%, hasta aproximadamente 50% o más.

Los animales contemplados pueden ser los animales generalmente considerados animales domesticados, incluyendo mascotas (por ejemplo, especies caninas, felinas, aviares, etc.) y los útiles para el procesamiento de productos alimentarios, es decir, aviares tales como pollos y pavos criados para carne y ponedores, ovinos tales como cordero, bovinos tales como vacas de carne y vacas lecheras, peces y porcinos. Estos animales se denominan "transgénicos" cuando se ha integrado cromosómicamente en dicho animal una secuencia de ADN heteróloga, o una o más secuencias de ADN adicionales normalmente endógenas del animal (denominadas colectivamente en el presente documento "transgenes"), en las células germinales del animal. El animal transgénico (incluyendo su descendencia) también tendrá el transgén integrado de forma casual en los cromosomas de células somáticas.

50 Metodologías de exploración y dispositivos de control "en línea"

Puede usarse una diversidad de aparatos y metodologías junto con los polipéptidos y ácidos nucleicos de la invención, por ejemplo, para explorar polipéptidos con respecto a actividad fitasa, para explorar compuestos como moduladores potenciales de la actividad (por ejemplo, potenciación o inhibición de la actividad enzimática), para anticuerpos que se unan a un polipéptido de la invención, para ácidos nucleicos que hibriden con un ácido nucleico de la invención y similares.

Soportes sólidos de enzima inmovilizada

Las enzimas fitasa, fragmentos de las mismas y ácidos nucleicos que codifican las enzimas y fragmentos pueden fijarse a un soporte sólido. Esto es con frecuencia económico y eficaz en el uso de las fitasas en procesos industriales. Por ejemplo, puede unirse un conjunto o cóctel de enzimas fitasa (o fragmentos activos de las mismas), que se usan en una reacción química específica, a un soporte sólido y se sumergen en una cubeta de procesado. Puede producirse la reacción enzimática. Después, el soporte sólido puede sacarse de la cubeta, junto con las enzimas unidas al mismo, para su uso repetido. Puede fijarse un ácido nucleico aislado de la invención a un soporte sólido seleccionado opcionalmente de un gel, una resina, un polímero, una cerámica, un vidrio, un microelectrodo y

cualquier combinación de los mismos.

Por ejemplo, los soportes sólidos útiles incluyen geles. Algunos ejemplos de los geles incluyen Sepharose, gelatina, glutaraldehído, glutaraldehído tratado con quitosano, albúmina-glutaraldehído, quitosano-Xantano, gel toyopearl (gel polimérico), alginato, alginato-polilisina, carragenina, agarosa, glioxil agarosa, agarosa magnética, dextrán-agarosa, hidrogel de poli(Carbamoil Sulfonato), hidrogel de BSA-PEG, alcohol polivinílico fosforilado (PVA), monoaminoetil-N-aminoetilo (MANA), amino o cualquier combinación de los mismos.

Otros soportes sólidos útiles son resinas o polímeros. Algunos ejemplos de resinas o polímeros incluyen celulosa, acrilamida, nylon, rayón, poliéster, resina de intercambio aniónico, AMBERLITE™ XAD-7, AMBER-LITE™ XAD-8, AMBERLITE™ IRA-94, AMBERLITE™ IRC-50, polivinilo, poliacrílico, polimetacrilato o cualquier combinación de los mismos. Otro tipo de soporte sólido útil es la cerámica. Algunos ejemplos incluyen cerámica no porosa, cerámica porosa, SiO₂, Al₂O₃. Otro tipo de soporte sólido útil es el vidrio. Algunos ejemplos incluyen vidrio no poroso, vidrio poroso, vidrio de aminopropilo o cualquier combinación de los mismos. Otro tipo de soporte sólido que puede usarse en un microelectrodo. Un ejemplo es una magnetita recubierta con polietilenimina. Pueden usarse partículas de grafito como un soporte sólido. Otro ejemplo de un soporte sólido es una célula, tal como un glóbulo rojo.

Métodos de inmovilización

Hay muchos métodos que se conocerán por un experto en la materia para inmovilizar enzimas o fragmentos de los mismos, o ácidos nucleicos, en un soporte sólido. Algunos ejemplos de dichos métodos incluyen, por ejemplo, generación de gotas electrostáticas, medios electroquímicos, mediante absorción, mediante unión covalente, mediante reticulación, mediante una reacción o proceso químico, mediante encapsulación, mediante atrapamiento, mediante alginato cálcico o mediante poli(2-hidroxietil metacrilato). Se describen métodos similares en *Methods in Enzymology, Immobilized Enzymes and Cells, Part C. 1987. Academic Press. Editado por S. P. Colowick y N. O. Kaplan. Volumen 136; e Immobilization of Enzymes and Cells. 1997. Humana Press. Editado por G. F. Bickerstaff. Series: Methods in Biotechnology, Editado por J. M. Walker.*

Series capilares

Pueden usarse series capilares, tales como la GIGAMATRIX™, Diversa Corporation, San Diego, CA. Los ácidos nucleicos o polipéptidos de la invención pueden inmovilizarse en o aplicarse a una serie, incluyendo series capilares. Las series pueden usarse para explorar con respecto a o controlar las bibliotecas de composiciones (por ejemplo, moléculas pequeñas, anticuerpos, ácidos nucleicos, etc.) con respecto a su capacidad para unirse a o modular la actividad de un ácido nucleico o un polipéptido de la invención. Las series capilares proporcionan otro sistema para contener y explorar las muestras. Por ejemplo, un aparato de exploración de muestras puede incluir una pluralidad de capilares formados en una serie de capilares adyacentes, donde cada capilar comprende al menos una pared que define una luz para retener una muestra. El aparato puede incluir además material intersticial dispuesto entre capilares adyacentes en la serie, y uno o más indicios de referencia formados dentro del material intersticial. Un capilar para explorar una muestra, donde el capilar se adapta para unirse en una serie de capilares, puede incluir una primera pared que define una luz para retener la muestra, y una segunda pared formada de un material de filtrado, para filtrar la energía de excitación proporcionada a la luz para excitar la muestra.

Puede introducirse un polipéptido o ácido nucleico, por ejemplo, un ligando, en un primer componente en al menos una parte de un capilar de una serie capilar. Cada capilar de la serie capilar puede comprender al menos una pared que define una luz para retener el primer componente. Puede introducirse una burbuja de aire en el capilar detrás del primer componente. Puede introducirse un segundo componente en el capilar, donde el segundo componente se separa del primer componente por la burbuja de aire. Puede introducirse una muestra de interés como un primer líquido marcado con una partícula detectable en un capilar de una serie capilar, donde cada capilar de la serie capilar comprende al menos una pared que define una luz para retener el primer líquido y la partícula detectable, y donde la al menos una pared está recubierta con un material de unión para unir la partícula detectable con la al menos una pared. El método puede incluir además retirar el primer líquido del tubo capilar, donde la partícula detectable unida se mantiene dentro del capilar, e introducir un segundo líquido en el tubo capilar.

La serie capilar puede incluir una pluralidad de capilares individuales que comprenden al menos una pared externa que define una luz. La pared externa del capilar puede ser una o más paredes fusionadas entre sí. De forma similar, la pared puede definir una luz que es cilíndrica, cuadrada, hexagonal o de cualquier otra forma geométrica siempre que las paredes formen una luz para retención de un líquido o muestra. Los capilares de la serie capilar pueden mantenerse juntos en proximidad estrecha para formar una estructura plana. Los capilares pueden unirse entre sí, fusionándose (por ejemplo, cuando los capilares estén hechos de vidrio) pegándose, enlazándose o pinzándose lateralmente. La serie capilar puede estar formada por cualquier número de capilares individuales, por ejemplo, una serie de 100 a 4.000.000 de capilares. Una serie capilar puede formar una placa de microtitulación que tenga aproximadamente 100.000 o más capilares individuales unidos entre sí.

Series o "microplacas biológicas"

Los ácidos nucleicos o polipéptidos de la invención pueden inmovilizarse en o aplicarse a una serie. Las series pueden usarse para explorar con respecto a o controlar bibliotecas de composiciones (por ejemplo, moléculas pequeñas, anticuerpos, ácidos nucleicos, etc.) con respecto a su capacidad para unirse a, o modular la actividad de un ácido nucleico o un polipéptido de la invención, por ejemplo, un parámetro controlado es la expresión de transcrito de un gen de fitasa. Uno o más de, o todos los transcritos de una célula pueden medirse por hibridación de una muestra que comprende transcritos de la célula o ácidos nucleicos representativos de o complementarios de transcritos de una célula, por hibridación con ácidos nucleicos inmovilizados en una serie o "microplaca biológica". Usando una "serie" de ácidos nucleicos en una microplaca, algunos o todos los transcritos de una célula pueden cuantificarse simultáneamente. Como alternativa, también pueden usarse series que comprenden ácido nucleico genómico para determinar el genotipo de una nueva cepa obtenida por ingeniería genética. También pueden usarse "series polipeptídicas" para cuantificar simultáneamente una pluralidad de proteínas.

En aspectos alternativo, las "series" o "microseries" o "microplacas biológicas" o "microplacas" comprenden una pluralidad de elementos diana además de un ácido nucleico y/o un polipéptido o péptido de la invención; cada elemento diana puede comprender una cantidad definida de uno o más polipéptidos (incluyendo anticuerpos) o ácidos nucleicos inmovilizados en un área definida de una superficie de sustrato, como se analiza en más detalle, posteriormente.

Estos pueden usarse cualquier "serie" conocida, también denominada "microserie", "serie de ácidos nucleicos", "serie de polipéptidos", "serie de anticuerpos" o "microplaca biológica" o variación de las mismas. Las series son de forma genérica una pluralidad de "puntos" o "elementos diana", comprendiendo cada elemento diana una cantidad definida de una o más moléculas biológicas, por ejemplo, oligonucleótidos, inmovilizadas en un área definida de una superficie de sustrato para unión específica con una molécula de muestra, por ejemplo, transcritos de ARNm.

Series y/o método para preparar e incorporar series se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 6.277.628; 6.277.489; 6.261.776; 6.258.606; 6.054.270; 6.048.695; 6.045.996; 6.022.963; 6.013.440; 5.965.452; 5.959.098; 5.856.174; 5.830.645; 5.770.456; 5.632.957; 5.556.752; 5.143.854; 5.807.522; 5.800.992; 5.744.305; 5.700.637; 5.556.752; 5.434.049; véase también, por ejemplo, documentos WO 99/51773; WO 99/09217; WO 97/46313; WO 96/17958; véase también, por ejemplo, Johnston (1998) Curr. Biol. 8:R171-R174; Schummer (1997) Biotechniques 23: 1087-1092; Kern (1997) Biotechniques 23: 120-124; Solinas-Toldo (1997) Genes, Chromosomes & Cancer 20: 399-407; Bowtell (1999) Nature Genetics Sup. 21: 25-32. Véase también las solicitudes de patente de Estados Unidos publicadas N° 20010018642; 20010019827; 20010016322; 20010014449; 20010014448; 20010012537; 20010008765.

35 Polipéptidos y péptidos

La invención proporciona polipéptidos de fitasa aislados, sintéticos o recombinantes que tienen una secuencia de aminoácidos con al menos 95%, 96% 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEC ID N°: 2, y que comprenden la o las mutaciones discutidas en la presente. La invención proporciona además ácidos nucleicos aislados, sintéticos o recombinantes que codifican tales polipéptidos.

Para referencia, la SEC ID N°: 2 "parental" generada sintéticamente es:

Met	Lys	Ala	Ile	Leu	Ile	Pro	Phe	Leu	Ser	Leu	Leu	Ile	Pro	Leu	Thr
1				5						10				15	
Pro	Gln	Ser	Ala	Phe	Ala	Gln	Ser	Glu	Pro	Glu	Leu	Lys	Leu	Glu	Ser

20 25 30
 Val Val Ile Val Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Ala Thr
 35 40 45
 Gln Leu Met Gln Asp Val Thr Pro Asp Ala Trp Pro Thr Trp Pro Val
 50 55 60
 Lys Leu Gly Glu Leu Thr Pro Arg Gly Gly Glu Leu Ile Ala Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gly His Tyr Trp Arg Gln Arg Leu Val Ala Asp Gly Leu Leu Pro Lys
 85 90 95
 Cys Gly Cys Pro Gln Ser Gly Gln Val Ala Ile Ile Ala Asp Val Asp
 100 105 110
 Glu Arg Thr Arg Lys Thr Gly Glu Ala Phe Ala Ala Gly Leu Ala Pro
 115 120 125
 Asp Cys Ala Ile Thr Val His Thr Gln Ala Asp Thr Ser Ser Pro Asp
 130 135 140
 Pro Leu Phe Asn Pro Leu Lys Thr Gly Val Cys Gln Leu Asp Asn Ala
 145 150 155 160
 Asn Val Thr Asp Ala Ile Leu Glu Arg Ala Gly Gly Ser Ile Ala Asp
 165 170 175
 Phe Thr Gly His Tyr Gln Thr Ala Phe Arg Glu Leu Glu Arg Val Leu
 180 185 190
 Asn Phe Pro Gln Ser Asn Leu Cys Leu Lys Arg Glu Lys Gln Asp Glu
 195 200 205
 Ser Cys Ser Leu Thr Gln Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Val Ser Ala
 210 215 220
 Asp Cys Val Ser Leu Thr Gly Ala Val Ser Leu Ala Ser Met Leu Thr
 225 230 235 240
 Glu Ile Phe Leu Leu Gln Gln Ala Gln Gly Met Pro Glu Pro Gly Trp
 245 250 255
 Gly Arg Ile Thr Asp Ser His Gln Trp Asn Thr Leu Leu Ser Leu His
 260 265 270
 Asn Ala Gln Phe Asp Leu Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser
 275 280 285
 Arg Ala Thr Pro Leu Leu Asp Leu Ile Lys Thr Ala Leu Thr Pro His
 290 295 300
 Pro Pro Gln Lys Gln Ala Tyr Gly Val Thr Leu Pro Thr Ser Val Leu
 305 310 315 320
 Phe Ile Ala Gly His Asp Thr Asn Leu Ala Asn Leu Gly Gly Ala Leu
 325 330 335
 Glu Leu Asn Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly

	340		345		350											
	Gly	Glu	Leu	Val	Phe	Glu	Arg	Trp	Arg	Leu	Ser	Asp	Asn	Ser	Gln	
		355						360					365			
	Trp	Ile	Gln	Val	Ser	Leu	Val	Phe	Gln	Thr	Leu	Gln	Gln	Met	Arg	Asp
		370					375						380			
	Lys	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Asn	Thr	Pro	Pro	Gly	Glu	Val	Lys	Leu	Thr
		385					390				395				400	
	Leu	Ala	Gly	Cys	Glu	Glu	Arg	Asn	Ala	Gln	Gly	Met	Cys	Ser	Leu	Ala
				405						410					415	
	Gly	Phe	Thr	Gln	Ile	Val	Asn	Glu	Ala	Arg	Ile	Pro	Ala	Cys	Ser	Leu
				420					425						430	

En la Figura 4, se muestra la secuencia de la fitasa parental SEC ID No: 2, codificada por, por ejemplo, la SEC ID No: 1, que muestra las modificaciones de la secuencia generadas por mutagénesis de saturación del sitio génico (GSSM) seleccionadas para la construcción de la biblioteca GeneReassembly™, según se describe en el Ejemplo 1.

5 La fitasa parental SEC ID No: 2, codificada por, por ejemplo, la SEC ID No: 1, se sometió a modificaciones adicionales de la secuencia por mutagénesis de saturación del sitio génico (GSSM), mutagénesis dirigida al sitio (SDM) y construcción de la biblioteca TMCA, según se describe en el Ejemplo 2.

10 Los polipéptidos y péptidos de la invención tienen actividad fitasa. También pueden ser útiles como, por ejemplo, sondas marcadoras, antígenos, tolerágenos, motivos, sitios activos de fitasa.

En aspectos alternativos, los polipéptidos y péptidos de la invención son sintéticos o son polipéptidos generados de forma recombinante. Las proteínas y péptidos pueden expresarse de forma recombinante *in vitro* o *in vivo*. Los péptidos y polipéptidos de la invención pueden realizarse y aislarse usando cualquier método conocido en la técnica.

15 Los polipéptidos y péptidos de la invención también pueden sintetizarse, completos o en parte, usando métodos químicos bien conocidos en la técnica. Véase por ejemplo, Caruthers (1980) Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 215-223; Horn (1980) Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 225-232; Banga, A. K., Therapeutic Peptides and Proteins, Formulation, Processing and Delivery Systems (1995) Technomic Publishing Co., Lancaster, PA. Por ejemplo, puede realizarse síntesis peptídica usando diversas técnicas de fase sólida (véase por ejemplo, Roberge (1995) Science 269: 202;

20 Merrifield (1997) Methods Enzymol. 289: 313) y puede conseguirse síntesis automática, por ejemplo, usando el Sintetizador Peptídico ABI 431A (Perkin Elmer) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

Las enzimas y polinucleótidos de la presente invención pueden proporcionarse en una forma aislada o purificada hasta su homogeneidad. El polipéptido fitasa de la invención puede obtenerse usando cualquiera de varios métodos convencionales. Por ejemplo, pueden producirse polipéptidos de fitasa en un sistema de expresión recombinante convencional (como se describe en el presente documento), sintetizarse químicamente (aunque limitado en cierto grado a fragmentos peptídicos de fitasa pequeños), o purificarse de organismos en los que se expresan de forma natural. Los métodos de expresión recombinantes útiles incluyen huéspedes de mamífero, huéspedes microbianos y huéspedes vegetales.

30 En aspectos alternativos, los polipéptidos y péptidos de la invención comprenden "aminoácidos" o "secuencias de aminoácidos" que son oligopéptidos, péptidos, polipéptidos o secuencias proteicas, o, como alternativa, son fragmentos, partes o subunidades de cualquiera de estos, y moléculas sintéticas o de origen natural.

35 En aspecto alternativos, los polipéptidos o proteínas "recombinantes" de la invención incluyen (se refieren a) polipéptidos o proteínas producidos por técnicas de ADN recombinante; por ejemplo, producidos a partir de células transformadas por una construcción de ADN exógena que codifica el polipéptido o proteína deseado. Los ácidos nucleicos (incluyendo oligonucleótidos), polipéptidos o proteínas "sintéticos" de la invención incluyen los preparados por síntesis química, como se describe en detalle en el presente documento. En aspectos alternativos, los

40 polipéptidos o proteínas de la invención comprenden aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isómeros peptídicos y pueden contener aminoácidos modificados distintos de los 20 aminoácidos codificados por genes. Los polipéptidos pueden modificarse por procesos naturales, tales como procesamiento postraduccional, o por técnicas de modificación química que se conocen bien en este campo. Las modificaciones pueden producirse en cualquier lugar del polipéptido, incluyendo la cadena principal peptídica, las cadenas laterales de aminoácidos y los extremos amino o carboxilo terminal. Se apreciará que el mismo tipo de

45 modificación puede estar presente en el mismo o diversos grados en varios sitios en un polipéptido dado. Un polipéptido dado también puede tener muchos tipos de modificaciones, por ejemplo, acetilación, acilación, ADP-robosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto de hemo, unión covalente de un

nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de un fosfatidilinositol, ciclación de reticulación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, carboxilación gamma, glucosilación, formación de anclaje GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfación y adición de aminoácidos mediada por ARN de transferencia a proteína tal como arginilación.

En aspectos alternativos, los polipéptidos o proteínas "sintéticos" son los preparados por síntesis química. También pueden usarse métodos de síntesis peptídica química de fase sólida para sintetizar el polipéptido o fragmentos de la invención. Dicho método se ha conocido en la técnica desde el principio de los años 60 (Merrifield, R. B., J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2154, 1963) (Véase también Stewart, J. M. y Young, J. D., Solid Phase Peptide Synthesis, 2 ed., Pierce Chemical Co., Rockford, Ill., pp. 11-12) y se ha empleado recientemente en kits de diseño y síntesis de péptidos de laboratorio disponibles en el mercado (Cambridge Research Biochemicals). Dichos kits de laboratorio disponibles en el mercado han utilizado en general las enseñanzas de H. M. Geysen *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81: 3998 (1984) y posibilitan la síntesis de péptidos sobre las puntas de una multitud de "varillas" o "clavijas" todas las cuales están conectadas a un única placa. Cuando se utiliza dicho sistema, una placa de varillas o clavijas se invierte y se inserta en una segunda placa de pocillos o depósitos correspondientes, que contienen soluciones para unión o anclaje de un aminoácido apropiado a las puntas de las varillas o las clavijas. Repitiendo dicha etapa del proceso, es decir, invirtiendo e insertando las puntas de las varillas y clavijas en soluciones apropiadas, se incluyen aminoácidos en péptidos deseados. Además, están disponibles varios sistemas de síntesis de péptidos de FMOC disponibles. Por ejemplo, el ensamblaje de un polipéptido o fragmento puede llevarse a cabo en un soporte sólido usando un sintetizador peptídico automático de Applied Biosystems, Inc. Modelo 431A. Dicho equipamiento proporciona acceso fácil a los péptidos de la invención, por síntesis directa o por síntesis de una serie de fragmentos que pueden acoplarse usando otras técnicas conocidas.

En aspectos alternativos, los péptidos y polipéptidos de la invención están glucosilados. La glucosilación puede añadirse postraduccionalmente de forma química o por mecanismos biosintéticos celulares, donde este último incorpora el uso de motivos de glucosilación conocidos, que pueden ser nativos de la secuencia o pueden añadirse como un péptido o añadirse en la secuencia codificante de ácidos nucleicos. La glucosilación puede ser ligada a O o ligada a N, o una combinación de las mismas.

En aspectos alternativos, los péptidos y polipéptidos de la invención, como se han definido anteriormente, comprenden formas "miméticas" y "peptidomiméticas", en parte o completamente. En un aspecto, los términos "mimético" y "peptidomimético" se refieren a un compuesto químico sintético que tiene sustancialmente las mismas características estructurales y/o funcionales de los polipéptidos de la invención. El mimético puede estar compuesto completamente de análogos sintéticos, no naturales, de aminoácidos, o es una molécula quimérica de aminoácidos peptídicos parcialmente naturales y análogos parcialmente no naturales de aminoácidos. El mimético también puede incorporar cualquier cantidad de sustituciones conservativas de aminoácidos naturales siempre que dichas sustituciones no alteren sustancialmente la estructura y/o actividad del mimético. Como con los polipéptidos de la invención que son variantes conservativas, la experimentación rutinaria determinará si un mimético está dentro del alcance de la invención, es decir, que su estructura y/o función no está sustancialmente alterada. Por lo tanto, en un aspecto, una composición mimética está dentro del alcance de la invención si tiene una actividad fitasa.

En aspectos alternativos, los péptidos y polipéptidos de la invención tienen secuencias que comprenden la modificación específica de SEC ID N°: 2, como se ha definido anteriormente, y también sustituciones conservativas que pueden modificar o no la actividad, por ejemplo, actividad enzimática. En aspectos alternativos, son sustituciones conservativas las que sustituyen un aminoácido dado en un polipéptido por otro aminoácido de características similares. En aspectos alternativos, son sustituciones conservativas los siguientes reemplazos: reemplazo de un aminoácido alifático tal como Ala, Val, Leu e Ile con otro aminoácido alifático; reemplazo de una Ser con un Thr o viceversa; reemplazo de un resto ácido tal como Asp y Glu con otro resto ácido; reemplazo de un resto que porta un grupo amida, tal como Asn y Gln, con otro resto que porta un grupo amida; intercambio de un resto básico tal como Lys y Arg con otro resto básico; y reemplazo de un resto aromático tal como Phe, Tyr con otro resto aromático.

Las composiciones miméticas de polipéptidos de la invención pueden contener cualquier combinación de componentes estructurales no naturales. En un aspecto alternativo, las composiciones miméticas de la invención incluyen uno o todos de los tres grupos estructurales siguientes: a) grupos de enlace de restos distintos de los enlaces de unión a amida natural ("enlace peptídico"); b) restos no naturales en lugar de restos de aminoácidos de origen natural; o c) restos que inducen imitación estructural secundaria, es decir, para inducir o estabilizar una estructura secundaria, por ejemplo, una vuelta beta, vuelta gamma, lámina beta, conformación de hélice alfa y similares. Por ejemplo, un polipéptido de la invención puede caracterizarse como un mimético cuando todos o algunos de sus restos se unen por medios químicos distintos de enlaces peptídicos naturales. Los restos peptidomiméticos individuales pueden unirse por enlaces peptídicos, otros enlaces químicos o medios de acoplamiento, tales como, por ejemplo, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, maleimidias bifuncionales, N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) o N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC). Los grupos de enlace que pueden ser una alternativa a los enlaces de unión amida tradicional ("enlace peptídico") incluyen, por ejemplo, quetometileno (por

ejemplo, -C(=O)-CH₂- para -C(=O)-NH-, aminometileno (CH₂-NH), etileno, olefina (CH=CH), éter (CH₂-O), tioéter (CH₂-S), tetrazol (CN₄-), tiazol, retroamida, tioamida o éster (véase, por ejemplo, Spatola (1983) in Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol. 7, pp 267-357, "Peptide Backbone Modifications," Marcell Dekker, NY).

5 Un polipéptido de la invención también puede caracterizarse como un mimético por contener todos o algunos restos no naturales en lugar de restos de aminoácidos de origen natural. Se describen bien restos no naturales en la bibliografía científica y de patentes; se describen a continuación algunas composiciones no naturales ejemplares
10 útiles como miméticos de restos de aminoácidos naturales y directrices. Pueden generarse miméticos de aminoácidos aromáticos reemplazando por, por ejemplo, D o L-nafilalanina; D o L-fenilglicina; D o L-2 tienilalanina; D o L-1, 2, 3 o 4-pirenilalanina; D o L-3 tienilalanina; D o L-(2-piridinil)-alanina; D o L-(3-piridinil)-alanina; D o L-(2-pirazinil)-alanina; D o L-(4-iso-propil)-fenilglicina; D-(trifluorometil)-fenilglicina; D-(trifluorometil)-fenilalanina; D-p-fluoro-fenilalanina; D o L-p-bifenilfenilalanina; K o L-p-metoxi-bifenilfenilalanina; D o L-2-indol(alquil)alaninas; y D o L-alquilaininas, donde el alquilo puede ser metilo, etilo, propilo, hexilo, butilo, pentilo, isopropilo, isobutilo, sec-isotilo,
15 isopentilo sustituido o no sustituido o aminoácidos no ácidos. Los anillos aromáticos de un aminoácido no natural incluyen, por ejemplo, anillos aromáticos de tiazolilo, tiofenilo, pirazolilo, bencimidazolilo, naftilo, furanilo, pirrolilo y piridilo.

Pueden generarse miméticos de aminoácidos ácidos por sustitución por, por ejemplo, aminoácidos no carboxilados
20 manteniendo a la vez una carga negativa; (fosfono)alanina; treonina sulfatada. Los grupos laterales carboxilo (por ejemplo, aspartilo o glutamilo) también pueden modificarse selectivamente por reacción con carbodiimidas (R'-N-C-N-R') tales como, por ejemplo, 1-ciclohexil-3(2-morfolinil-(4-etil) carbodiimida o 1-etil-3(4-azonia-4,4- dimetolpentil) carbodiimida. El aspartilo o glutamilo también pueden convertirse a restos de asparaginilo y glutaminilo por reacción con iones de amonio. Pueden generarse miméticos de aminoácidos básicos por sustitución con, por ejemplo,
25 (además de lisina y arginina) los aminoácidos ornitina, citrulina o ácido (guanidino)-acético o ácido (guanidino)alquil-acético, donde el alquilo se ha definido anteriormente. El derivado de nitrilo (por ejemplo, que contiene el resto de CN en lugar de COOH) puede sustituir a asparagina o glutamina. Los restos de asparaginilo y glutaminilo pueden desaminarse a los restos de aspartilo o glutamilo correspondientes. Pueden generarse miméticos de restos de arginina haciendo reaccionar arginilo con, por ejemplo, uno o más reactivos convencionales, incluyendo, por
30 ejemplo, fenilgloxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona o ninhidrina, pudiendo ser preferible para estos reactivos usar condiciones alcalinas. Pueden generarse miméticos de restos de tirosina haciendo reaccionar tirosilo con, por ejemplo, compuestos de diazonio aromáticos o tetranitrometano. Puede usarse N-acetilimidazol y tetranitrometano para formar especies de O-acetil tirosilo y derivados de 3-nitro, respectivamente. Pueden generarse miméticos de restos de cisteína haciendo reaccionar restos de cisteinilo con, por ejemplo, alfa-haloacetatos tales
35 como ácido 2-cloroacético o cloroacetamida y aminas correspondientes; para proporcionar derivados de carboximetilo o carboxiamidometilo. También pueden generarse miméticos de restos de cisteína haciendo reaccionar restos de cisteinilo con, por ejemplo, bromo-trifluoroacetona, ácido alfa-bromo-beta-(5-imidozoi) propiónico; cloroacetilfosfato, N-alquilmaleimidias, disulfuro de 3-nitro-2-piridilo; disulfuro de metil 2-piridilo; p-cloromercuribenzoato; 2-cloromercuri-4 nitrofenol; o cloro-7-nitrobenzo-oxa-1,3-diazol. Pueden generarse miméticos de lisina (y pueden alterarse restos amino terminales) haciendo reaccionar lisinilo con, por ejemplo, anhídridos de
40 ácido succínico u otros carboxílicos. También pueden generarse miméticos de restos de lisina y otros que contienen amino alfa por reacción con imidoésteres, tales como metil picolinimidato, piridoxal fosfato, piridoxal, cloroborohidruro, ácido trinitro bencenosulfónico, O-metilisourea, 2,4, pentanodiona, y reacciones catalizadas por transamidasa con glixilato. Pueden generarse miméticos de metionina por reacción con, por ejemplo, sulfóxido de metionina. Los miméticos de prolina incluyen, por ejemplo, ácido pipecólico, ácido tiazolidin carboxílico, 3 o 4-hidroxi prolina, deshidroprolina, 3 o 4-metilprolina o 3,3-dimetilprolina. Pueden generarse miméticos de restos de histidina haciendo reaccionar histidilo con, por ejemplo, dietilprocarbonato o bromuro de para-bromofenacilo. Otros miméticos incluyen, por ejemplo, los generados por hidroxilación de prolina y lisina; fosforilación de los grupos de hidroxilo de restos de serilo o treonilo; metilación de los grupos alfa amino de lisina, arginina e histidina; acetilación
50 de la amina N terminal; metilación de los restos de amida de cadena principal o sustitución con N-metil amino ácidos; o amidación de grupos carboxilo C terminales.

Un resto, por ejemplo, un aminoácido, de un polipéptido de la invención también puede reemplazarse por un
55 aminoácido (o resto peptidomimético) de la quiralidad opuesta. Por lo tanto, cualquier aminoácido de origen natural en la configuración L (que también puede denominarse la R o S, dependiendo de la estructura de la entidad química) puede reemplazarse con el aminoácido del mismo tipo estructural químico o un peptidomimético, pero de la quiralidad opuesta, denominado aminoácido D, pero también puede denominarse forma R o S.

Los métodos para modificar los polipéptidos de la invención pueden ser por procesos naturales, tales como
60 procesamiento postraducciona (por ejemplo, fosforilación, acilación, etc.) o por técnicas de modificación química. Pueden producirse modificaciones en cualquier lugar del polipéptido, incluyendo la cadena principal peptídica, las cadenas laterales de aminoácidos y los extremos amino o carboxilo terminal. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo o diversos grados en varios sitios en un polipéptido dado. Además un polipéptido dado puede tener muchos tipos de modificaciones. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación,
65 ribosilación de ADP, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto de hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de un

fosfatidilinositol, ciclación de reticulación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, carboxilación gamma, glucosilación, formación de anclaje de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfación y adición de aminoácidos mediada por ARN de transferencia a una proteína tal como arginilación. Véase, por ejemplo, Creighton, T. E., *Proteins - Structure and Molecular Properties* 2ª Ed., W. H. Freeman and Company, Nueva York (1993); *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York, pp. 1-12 (1983).

También pueden usarse métodos de síntesis química de péptidos en fase sólida para sintetizar el polipéptido o fragmentos de la invención. Dicho método se ha conocido en la técnica desde los primeros años de la década de 1960 (Merrifield, R. B., *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154, 1963) (Véase también Stewart, J. M. y Young, J. D., *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2ª Ed., Pierce Chemical Co., Rockford, Ill., pág. 11-12) y recientemente se ha empleado en kits de diseño síntesis de péptidos de laboratorio disponibles en el mercado (Cambridge Research Biochemicals). Dichos kits de laboratorio disponibles en el mercado han utilizado en líneas generales los contenidos de H. M. Geysen et al, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 81:3998 (1984) y proporcionan la síntesis de péptidos sobre las puntas de multitud de "varillas" o "clavijas" todos las cuales están conectados con una única placa. Cuando se utiliza dicho sistema, se invierte una placa de varillas o clavijas y se inserta en una segunda placa de pocillos o depósitos correspondientes, que contienen soluciones para unir o anclar un aminoácido apropiado a la punta de la clavija o la varilla. Repitiendo dicha etapa del proceso, es decir, invirtiendo e insertando las puntas de las varillas y clavijas en soluciones apropiadas, se construyen aminoácidos en péptidos deseados. Además, están disponibles varios sistemas de síntesis de péptidos FMOC. Por ejemplo, el ensamblaje de un polipéptido o fragmento puede realizarse en un soporte sólido usando un sintetizador automatizado de péptidos Applied Biosystems, INC. Modelo 431A™. Dicho equipo proporciona acceso fácil a los péptidos de la invención, por síntesis directa o por síntesis de una serie de fragmentos que pueden acoplarse usando otras técnicas conocidas.

En un aspecto, los péptidos y polipéptidos de la invención tienen secuencias que comprenden la modificación específica a la SEC ID N° 1, como se ha definido anteriormente, y también secuencias de aminoácidos "sustancialmente idénticas", es decir, una secuencia que difiere en una o más sustituciones, deleciones o inserciones conservativas o no conservativas de aminoácidos, particularmente cuando dicha sustitución sucede en un sitio que no es el sitio activo de la molécula, y con la condición de que el polipéptido retenga esencialmente sus propiedades funcionales. En un aspecto, los péptidos y polipéptidos de la invención tienen secuencias que comprenden la modificación específica a la SEC ID N° 2, como se ha definido anteriormente, y sustituciones conservativas de aminoácidos que sustituyen un aminoácido por otro de la misma clase, por ejemplo, la sustitución de un aminoácido hidrófobo, tal como isoleucina, valina, leucina, o metionina, por otro, o sustitución de un aminoácido polar por otro, tal como la sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico o glutamina por asparagina. En un aspecto, puede deleccionarse uno o más aminoácidos, por ejemplo, de un polipéptido fitasa de la invención para provocar una modificación de la estructura del polipéptido sin alterar significativamente su actividad biológica, o como alternativa, para alterar significativamente a propósito su actividad biológica. Por ejemplo, pueden retirarse y/o añadirse aminoácidos amino o carboxilo terminales que son necesarios, o como alternativa no son necesarios, para la actividad biológica fitasa. Las secuencias polipeptídicas modificadas de la invención pueden ensayarse para la actividad biológica fitasa por varios métodos, incluyendo el contacto de la secuencia polipeptídica modificada con un sustrato de fitasa y la determinando si el polipéptido modificado disminuye la cantidad de sustrato específico en el ensayo o aumenta los bioproductos de la reacción enzimática de un polipéptido fitasa funcional con el sustrato.

Otro aspecto de la invención comprende polipéptidos que tienen una identidad de secuencia de aproximadamente el 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más con la SEC ID N° 2 y que tiene la (las) modificación (modificaciones) específica(s) de secuencia enumerada(s), como se ha analizado anteriormente.

Estas variantes de secuencia de aminoácidos de la invención pueden caracterizarse por una naturaleza predeterminada de la variación, una característica que los diferencia de los de origen natural, por ejemplo, una variación alélica o interespecie de una secuencia de fitasa. En un aspecto, las variantes de la invención muestran la misma actividad biológica cualitativa que el análogo de origen natural. Como alternativa, las variantes pueden seleccionarse para que tengan características modificadas. En un aspecto, aunque el sitio o región para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminada, la mutación per se no tiene que predeterminarse. Por ejemplo, para optimizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, puede realizarse mutagénesis aleatoria en el codón o región diana y pueden explorarse las variantes de fitasa expresadas para la combinación óptima de actividad deseada. Son bien conocidas las técnicas para hacer mutaciones de sustitución en sitios predeterminados en ADN que tiene una secuencia conocida, como se analiza en este documento por ejemplo, mutagénesis con cebador M13 y mutagénesis por PCR. La exploración de los mutantes puede hacerse usando, por ejemplo, ensayos de catálisis de fitato (hexafosfato de mioinositol) en inositol y fosfato inorgánico; o, la hidrólisis de fitato (hexafosfato de mioinositol). En aspectos alternativos, las sustituciones de aminoácidos pueden ser restos individuales; las inserciones pueden ser del orden de aproximadamente 1 a 20 aminoácidos, aunque pueden hacerse inserciones considerablemente más grandes. Las deleciones pueden variar de aproximadamente 1 a aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70 restos o más. Para obtener un derivado final con las propiedades óptimas, pueden usarse sustituciones, deleciones, inserciones o cualquier combinación de las mismas. Generalmente, estos cambios se

hacen en unos pocos aminoácidos para minimizar la alteración de la molécula. Sin embargo, pueden tolerarse cambios más grandes en ciertas circunstancias.

5 Los polipéptidos de la invención pueden obtenerse a través de enriquecimiento bioquímico o procedimientos de purificación. La secuencia de polipéptidos potencialmente homólogos o fragmentos puede determinarse por digestión proteolítica, electroforesis en gel y/o microsecuenciación.

10 Los polipéptidos de la invención pueden usarse para catalizar reacciones bioquímicas para indicar que un fragmento o variante retiene la actividad enzimática de un polipéptido de la invención.

15 Un ensayo ejemplar para determinar si fragmentos o variantes retienen la actividad enzimática de los polipéptidos de la invención comprende: poner en contacto el fragmento o variante polipeptídico con una molécula sustrato en condiciones que permitan que el fragmento o variante polipeptídico funcione, y detectar una disminución en el nivel de sustrato o un aumento en el nivel del producto de reacción específico de la reacción entre el polipéptido y el sustrato.

Los polipéptidos de la invención pueden usarse para catalizar reacciones bioquímicas.

20 La invención proporciona fitasas que tienen ninguna secuencia señal o que tienen secuencias señal modificadas (también llamadas péptidos señal (SP), o péptidos líder), o secuencias señal heterólogas. Los polipéptidos de la invención también pueden tener ningún dominio prepro o tener dominios prepro heterólogos y/o dominios catalíticos (CD). Los SP modificados o heterólogos, los dominios prepro y/o los CD incorporados en un polipéptido de la invención pueden ser parte de una proteína de fusión, por ejemplo, como un dominio heterólogo en una proteína quimérica, o pueden añadirse mediante un agente de enlace químico. Por ejemplo, una enzima de la invención puede comprender un SP heterólogo y/o un dominio prepro en un vector, por ejemplo, un vector de la serie pPIC (Invitrogen, Carlsbad, CA).

30 Adicionalmente, los polipéptidos de la invención pueden comprender además secuencias heterólogas, secuencias de otras fitasas, o de fuentes no de fitasa, o secuencias completamente sintéticas. Por tanto, en un aspecto, un ácido nucleico de la invención comprende una secuencia codificante de una secuencia señal (SP) endógena, modificada o heteróloga, dominio prepro y/o dominio catalítico (CD) y una secuencia heteróloga (es decir, una secuencia no asociada de forma natural con la secuencia señal (SP), dominio prepro y/o dominio catalítico (CD) de la invención). La secuencia heteróloga puede estar en el extremo 3' terminal, extremo 5' terminal, y/o en ambos extremos del SP, dominio prepro y/o secuencia codificante de CD.

35 Los métodos para identificar secuencias de dominio "prepro" y secuencias señal son bien conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Van de Ven (1993) Crit. Rev. Oncog. 4(2):115-136. Por ejemplo, para identificar una secuencia prepro, la proteína se purifica a partir del espacio extracelular y se determina la secuencia proteica N-terminal y se compara con la forma no procesada. Diversos métodos de reconocimiento de secuencias señal son conocidos para los especialistas en la técnica. Por ejemplo, en un aspecto, los péptidos señal para su uso con polipéptidos de la invención se identifican mediante un método conocido como SignallP. SignallP usa una red neural combinada que reconoce tanto los péptidos señal como sus sitios de escisión; véase, por ejemplo, Nielsen (1997) "Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites" Protein Engineering 10:1-6.

45 La invención proporciona enzimas fitasa donde la estructura del esqueleto polipeptídico, la estructura secundaria o terciaria, por ejemplo, una estructura alfa-helicoidal o de lámina beta, se ha modificado. En un aspecto, la carga o hidrofobicidad se ha modificado. En un aspecto, se ha modificado el volumen de una cadena lateral. Se hacen cambios sustanciales en la función o la identidad inmunológica seleccionando sustituciones que son menos conservativas. Por ejemplo, pueden hacerse sustituciones que afectan de forma más significativa: la estructura del esqueleto polipeptídico en el área de la alteración, por ejemplo una estructura alfa-helicoidal o de lámina beta; una carga o un sitio hidrofóbico de la molécula, que puede estar en un sitio activo; o una cadena lateral. La invención proporciona sustituciones en el polipéptido de la invención donde (a) un resto hidrófilo, por ejemplo, serilo o treonilo, se sustituye en el lugar de (o por) un resto hidrófobo, por ejemplo, leucilo, isoleucilo, fenilalanilo, valilo o alanilo; (b) un cisteína o prolina se sustituye en el lugar de (o por) cualquier otro resto; (c) un resto que tiene una cadena lateral electropositiva, por ejemplo, lisilo, arginilo, o histidilo, se sustituye en el lugar de (o por) un resto electronegativo, por ejemplo, glutamilo o aspartilo; o (d) un resto que tiene una cadena lateral voluminosa, por ejemplo, fenilalanina, se sustituye en el lugar de (o por) uno que no tenga una cadena lateral, por ejemplo, glicina. Las variantes pueden mostrar la misma actividad biológica cualitativa (es decir, actividad enzimática fitasa) aunque pueden seleccionarse variantes para modificar las características de la fitasa según sea necesario.

60 En un aspecto, las fitasas de la invención comprenden epítomos o etiquetas de purificación, secuencias señal u otras secuencias de fusión, etc. En un aspecto, las fitasas de la invención pueden fusionarse a un péptido aleatorio para formar un polipéptido de fusión. Por "fusionado" o "unido de forma funcional" en este documento se entiende que el péptido aleatorio y la fitasa están unidos juntos, de tal modo que se minimiza la alteración en la estabilidad de la actividad fitasa. El polipéptido de fusión (o polinucleótido de fusión que codifica el polipéptido de fusión) puede comprender también componentes adicionales, incluyendo péptidos múltiples en múltiples bucles.

En un aspecto, las fitasas de la invención son polipéptidos quiméricos, por ejemplo, que comprenden SP heterólogos, módulos de unión a carbohidratos, dominios catalíticos de enzima fitasa, enlazadores y/o dominios catalíticos no de fitasa. La invención proporciona un medio para generar polipéptidos quiméricos que pueden
 5 codificar polipéptidos híbridos biológicamente activos (por ejemplo, enzimas fitasa híbridas). En un aspecto, los polinucleótidos originales codifican polipéptidos biológicamente activos. El método de la invención produce nuevos polipéptidos híbridos utilizando procesos celulares que integran la secuencia de los polinucleótidos originales de modo que el polinucleótido híbrido resultante codifique un polipéptido que muestre actividades derivadas de los polipéptidos biológicamente activos originales. Por ejemplo, los polinucleótidos originales pueden codificar una
 10 enzima particular de diferentes microorganismos. Una enzima codificada por un primer polinucleótido de un organismo o variante puede, por ejemplo, funcionar de forma eficaz en una condición ambiental particular, por ejemplo, elevada salinidad. Una enzima codificada por un segundo polinucleótido de un organismo diferente o variante puede funcionar de forma eficaz en una diferente condición ambiental, tal como temperaturas extremadamente elevadas. Un polinucleótido híbrido que contenga secuencias del primer y segundo polinucleótidos originales puede codificar una enzima que muestre características de ambas enzimas codificadas por los polinucleótidos originales. Por tanto, la enzima codificada por el polinucleótido híbrido puede funcionar de forma eficaz en condiciones ambientales compartidas por cada una de las enzimas codificadas por el primer y segundo polinucleótidos, por ejemplo, elevada salinidad y temperaturas extremas.

Por tanto, un polipéptido híbrido resultante de este método de la invención puede mostrar actividad enzimática especializada no presentada en las enzimas originales. Por ejemplo, tras la recombinación y/o redistribución reductora de los polinucleótidos que codifican las enzimas fitasa, el polipéptido híbrido resultante codificado por un polinucleótido híbrido puede explorarse para las actividades enzimáticas especializadas, por ejemplo, hidrolasa, peptidasa, fosforilasa, etc., actividades obtenidas de cada una de las enzimas originales. Por tanto, por ejemplo, el polipéptido híbrido puede explorarse para averiguar aquellas funcionalidades químicas que distinguen el polipéptido híbrido de los polipéptidos precursores originales, tales como la temperatura, pH o concentración salina a la cual funciona el polipéptido híbrido.

Un polipéptido híbrido puede mostrar actividad enzimática especializada no presentada en las enzimas originales. Por ejemplo, tras la recombinación y/o redistribución reductora de los polinucleótidos que codifican las actividades hidrolasa, el polipéptido híbrido resultante codificado por un polinucleótido híbrido puede explorarse para actividades hidrolasa especializadas obtenidas de cada una de las enzimas originales, es decir, el tipo de enlace sobre el cual actúa la hidrolasa y la temperatura a la cual funciona la hidrolasa. Por tanto, por ejemplo, puede explorarse una fitasa para averiguar aquellas funcionalidades químicas que distinguen la fitasa híbrida de las fitasas originales, tales como: (a) amida (enlaces peptídicos), es decir, proteasas; (b) enlaces éster, es decir, esterases y lipasas; (c) acetales, es decir, glicosidasas y, por ejemplo, la temperatura, pH o concentración salina a la cual funciona el polipéptido híbrido.

Puede producirse un polipéptido híbrido biológicamente activo y explorado para actividad potenciada mediante:

- 40 (1) introducción de al menos un primer polinucleótido en unión funcional y un segundo polinucleótido en unión funcional, compartiendo dicho al menos el primer polinucleótido y el segundo polinucleótido al menos una región de homología de secuencia parcial, en una célula hospedadora adecuada;
- 45 (2) cultivar la célula hospedadora en condiciones que promuevan la reorganización de secuencia produciendo un polinucleótido híbrido en unión funcional;
- (3) expresión de un polipéptido híbrido codificado por el polinucleótido híbrido;
- (4) exploración del polipéptido híbrido en condiciones que promuevan la identificación de la actividad biológica potenciada; y
- 50 (5) aislamiento del polinucleótido que codifica el polipéptido híbrido.

Los métodos para explorar diversas actividades enzimáticas son conocidos para los especialistas en la técnica y se analizan durante toda la presente memoria. Dichos métodos pueden emplearse cuando se aíslan los polipéptidos y polinucleótidos de la invención.

Pueden producirse formulaciones líquidas acuosas estabilizadas que tienen actividad fitasa que muestran resistencia aumentada a inactivación por calor de la actividad enzimática y que retienen su actividad fitasa durante periodos prolongados de almacenamiento. Las formulaciones líquidas se estabilizan mediante la adición de urea y/o un poliol tal como sorbitol y glicerol como agente estabilizador. También se proporcionan preparaciones de pienso para animales monogástricos y métodos para la producción de las mismas que resultan del uso de dichas formulaciones líquidas acuosas estabilizadas. Detalles adicionales respecto a este enfoque están en la bibliografía pública y/o son conocidos para los especialistas en la técnica. En una ejemplificación no limitante particular, dicha bibliografía disponible al público incluye el documento EP 0626010 (WO 9316175 A1) (Barendse *et al.*), aunque las referencias en la bibliografía disponible al público no muestren las moléculas inventivas de la presente solicitud.

65 Anticuerpos y métodos de exploración basados en anticuerpo

Estos anticuerpos que se unen específicamente a una fitasa de la invención pueden usarse para aislar, identificar o cuantificar las fitasas de la invención o polipéptidos relacionados. Estos anticuerpos pueden usarse para inhibir la actividad de una enzima de la invención. Estos anticuerpos pueden usarse para polipéptidos aislados relacionados con los de la invención, por ejemplo, enzimas fitasa relacionadas.

5 Tales anticuerpos pueden comprender un péptido o polipéptido derivado de, modelado después o codificado sustancialmente por un gen de inmunoglobulina o genes de inmunoglobulina, o fragmentos de los mismos, capaces de unirse específicamente a un antígeno o epítipo, véase, por ejemplo *Fundamental Immunology*, Tercera Edición, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993); Wilson (1994) *J. Immunol. Methods* 175:267-273; Yarmush (1992) *J. Biochem. Biophys. Methods* 25:85-97. El término anticuerpo incluye partes de unión a antígeno, es decir, "sitios de unión a antígeno", (por ejemplo, fragmentos, subsecuencias, regiones determinantes de complementariedad (CDR)) que retienen la capacidad de unirse al antígeno, incluyendo (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) *Nature* 341: 544-546), que consiste en un dominio VH; y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada. Los anticuerpos de cadena sencilla también se incluyen por referencia en el término "anticuerpo".

20 Los anticuerpos pueden usarse en inmunoprecipitación, tinción (por ejemplo, FACS), columnas de inmunoafinidad, y similares. Si se desea, pueden generarse secuencias de ácido nucleico que codifican antígenos específicos por inmunización seguido de aislamiento del polipéptido o ácido nucleico, amplificación o clonación e inmovilización del polipéptido en una serie. Como alternativa, puede modificarse la estructura de un anticuerpo producido por una célula, por ejemplo, la afinidad de un anticuerpo puede aumentarse o disminuirse. Además, la capacidad de preparar o modificar anticuerpos puede ser una modificación por ingeniería del fenotipo en una célula.

30 Los métodos de inmunización, para producir y aislar anticuerpos (policlonales y monoclonales) son conocidos para los especialistas en la técnica y se describen en la bibliografía científica y de patentes, véase, por ejemplo, Coligan, *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, Wiley/Greene, NY (1991); Stites (eds.) *BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY* (7^a ed.) Lange Medical Publications, Los Altos, CA ("Stites"); Goding, *MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE* (2^a ed.) Academic Press, Nueva York, NY (1986); Kohler (1975) *Nature* 256:495; Harlow (1988) *ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York. Los anticuerpos también pueden generarse *in vitro*, por ejemplo, usando bibliotecas de presentación en fagos que expresan sitios de unión a anticuerpo recombinantes, además de los métodos *in vivo* tradicionales usando animales. Véase, por ejemplo, Hoogenboom (1997) *Trends Biotechnol.* 15:62-70; Katz (1997) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26:27-45.

40 Los polipéptidos pueden usarse para generar anticuerpos que se unen específicamente a los polipéptidos de la invención. Los anticuerpos resultantes pueden usarse en procedimientos de cromatografía por inmunoafinidad para aislar o purificar el polipéptido o para determinar si el polipéptido está presente en una muestra biológica. En dichos procedimientos, se pone en contacto una preparación de proteínas, tal como un extracto, o una muestra biológica con un anticuerpo capaz de unirse específicamente a uno de los polipéptidos de la invención.

45 En procedimientos de inmunoafinidad, el anticuerpo se une a un soporte sólido, tal como una perla u otra matriz de columna. La preparación de proteínas se coloca en contacto con el anticuerpo en condiciones en las cuales el anticuerpo se une específicamente a uno de los polipéptidos de la invención. Después de un lavado para retirar las proteínas unidas no específicamente, se eluyen los polipéptidos unidos específicamente.

50 La capacidad de las proteínas en una muestra biológica de unirse al anticuerpo puede determinarse usando cualquiera de una diversidad de procedimientos familiares para los especialistas en la técnica. Por ejemplo, la unión puede determinarse marcando el anticuerpo con un marcador detectable tal como un agente fluorescente, un marcador enzimático, o un radioisótopo. Como alternativa, la unión del anticuerpo a la muestra puede detectarse usando un anticuerpo secundario que tenga dicho marcador detectable en el mismo. Ensayos particulares incluyen ensayos ELISA, ensayos tipo sándwich, radioinmunoensayos, y transferencias de Western.

55 Los anticuerpos policlonales generados contra los polipéptidos de la invención pueden obtenerse por inyección directa de los polipéptidos en un animal o por administración de los polipéptidos a un animal, por ejemplo, un no humano. El anticuerpo así obtenido entonces se unirá al propio polipéptido. De este modo, incluso una secuencia que codifique solamente un fragmento del polipéptido puede usarse para generar anticuerpos que pueden unirse al polipéptido nativo completo. Dichos anticuerpos entonces pueden usarse para aislar el polipéptido de células que expresan ese polipéptido.

65 Para la preparación de anticuerpos monoclonales, puede usarse cualquier técnica que proporcione anticuerpos producidos por cultivos continuos de líneas celulares. Ejemplos incluyen la técnica de hibridoma, la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de células B humanas, y la técnica de hibridoma EBV (véase, por ejemplo, Cole (1985) en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pág. 77-96).

Las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 4.946.778) pueden adaptarse para producir anticuerpos de cadena sencilla contra los polipéptidos de la invención. Como alternativa, pueden usarse ratones transgénicos para expresar anticuerpos humanizados contra estos polipéptidos o fragmentos de los mismos.

Los anticuerpos generados contra los polipéptidos de la invención pueden usarse en la exploración de polipéptidos similares a partir de otros organismos y muestras. En dichas técnicas, los polipéptidos del organismo se ponen en contacto con el anticuerpo y se detectan aquellos polipéptidos que se unen específicamente al anticuerpo. Cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente puede usarse para detectar la unión del anticuerpo.

Kits

La divulgación proporciona kits que comprenden las composiciones, por ejemplo, ácidos nucleicos, casetes de expresión, vectores, células, polipéptidos (por ejemplo, fitasas) y/o anticuerpos analizados en este documento. Los kits también pueden contener material de instrucciones que muestren las metodologías y usos industriales descritos en este documento.

Los polipéptidos de la invención también pueden usarse para generar anticuerpos que se unan específicamente a los polipéptidos o fragmentos de enzima. Los anticuerpos resultantes pueden usarse en procedimientos de cromatografía por inmovilización para aislar o purificar el polipéptido o para determinar si el polipéptido está presente en una muestra biológica. En dichos procedimientos, se pone en contacto una preparación de proteínas, tal como un extracto, o una muestra biológica con un anticuerpo capaz de unirse específicamente a una de un polipéptido de la SEC ID N° 2, secuencias sustancialmente idénticas al mismo, o fragmentos de las anteriores secuencias.

En procedimientos de inmunoadfinidad, el anticuerpo se une a un soporte sólido, tal como una perla u otra matriz de columna. La preparación de proteínas se coloca en contacto con el anticuerpo en condiciones en las cuales el anticuerpo se une específicamente a uno de los polipéptidos de la SEC ID N° 2, secuencias sustancialmente idénticas a los mismos, o fragmentos de los mismos. Después de un lavado para retirar las proteínas unidas no específicamente, se eluyen los polipéptidos unidos específicamente.

Las secuencias polinucleotídicas aisladas, la secuencia polipeptídica, variantes y mutantes de las mismas pueden medirse para la retención de la actividad biológica característica de la enzima de la presente invención, por ejemplo, en un ensayo para detectar la actividad enzimática fitasa (Food Chemicals Codex, 4ª Ed.). Dichas enzimas incluyen formas truncadas de fitasa, y variantes tales como variantes de delección e inserción de la secuencia polipeptídica expuesta en la SEC ID N° 2. Estas fitasas tienen termotolerancia. Es decir, las fitasas tienen una actividad específica residual de aproximadamente el 90% después de tratamiento a 70°C durante 30 minutos y aproximadamente el 50% después de tratamiento a 75°C durante 30 minutos. La termotolerancia de las fitasas de la invención es ventajosa en el uso de la enzima como aditivo de pienso ya que el pienso puede moldearse, granularse, o paletizarse a una elevada temperatura.

Por ejemplo, en un aspecto, la invención proporciona una matriz comestible de liberación enzimática en forma de gránulos y un método para su uso para el suministro de fitasa a un animal, por ejemplo como un suplemento nutricional. La matriz de liberación enzimática libera fácilmente una enzima fitasa en medio acuoso, tal como, por ejemplo, el fluido digestivo de un animal. La matriz de liberación enzimática de la invención se prepara a partir de un vehículo comestible granulado seleccionado entre componentes tales como germen de cereales que tienen el aceite agotado, heno, alfalfa, fleo, vaina de soja, harina de semilla de girasol, harina de trigo, y similares, que dispersan fácilmente la enzima recombinante contenida en el mismo en medio acuoso. En uso, la matriz comestible de liberación enzimática en forma de gránulos se administra a un animal para suministrar una fitasa al animal. Los sustratos basados en cereal adecuados pueden comprender o pueden derivarse de cualquier cereal comestible adecuado, tal como trigo, maíz, soja, sorgo, alfalfa, cebada, y similares. Un sustrato basado en cereal ejemplar es un sustrato basado en maíz. El sustrato puede derivarse de cualquier parte adecuada del cereal, por ejemplo, un germen de cereal, aprobado para uso en pienso animal, tal como germen de maíz que se obtiene en un proceso de molienda en húmedo o en seco. El germen de cereal puede comprender germen agotado, que es germen de cereal del cual se ha extraído el aceite, tal como por prensado o extracción con hexano u otro disolvente. Como alternativa, el germen de cereal se extrae por expulsión, es decir, el aceite se ha retirado por prensado.

La matriz de liberación enzimática de la invención está en forma de partículas plurales separadas, microsferas o gránulos. Por "gránulos" se entiende partículas que se comprimen o compactan, tal como por granulación, extrusión, o compactación similar para retirar el agua de la matriz. Dicha compresión o compactación de las partículas también promueve la cohesión entre partículas de las partículas. Por ejemplo, los gránulos pueden prepararse por granulación del sustrato basado en cereal en un molino de sedimentación. Los gránulos preparados de este modo se muelen o desmenuzan a un tamaño de gránulo adecuado para su uso como adyuvante en pienso animal. Como la matriz es en sí misma apropiada para su uso en pienso animal, puede usarse como diluyente para el suministro de enzimas en pienso animal.

- 5 La matriz de liberación enzimática puede estar en forma de gránulos que tienen un tamaño de gránulo que varía de aproximadamente malla 4 a aproximadamente 400 (USS); o de aproximadamente malla 8 a aproximadamente 80; o de aproximadamente malla 14 a aproximadamente 20. Si el germen de cereal está agotado mediante extracción con disolvente, puede ser necesario el uso de un agente de lubricidad tal como aceite de maíz en el granulador, pero dicho agente de lubricidad habitualmente no es necesario si el germen se extrae por prensado. La matriz puede prepararse mediante otros procesos de compactación o compresión tales como, por ejemplo, por extrusión del sustrato basado en cereal a través de un troquel y molienda del producto extruido a un tamaño de gránulo adecuado.
- 10 La matriz de liberación enzimática puede incluir adicionalmente un componente polisacárido como agente de cohesión para potenciar la cohesión de los gránulos de la matriz. Se cree que el agente de cohesión proporciona grupos hidroxilo adicionales, que potencian la unión entre las proteínas de cereal dentro del gránulo de la matriz. Se cree adicionalmente que los grupos hidroxilo adicionales funcionan potenciando el enlace de hidrógeno de proteínas con almidón y a otras proteínas. El agente de cohesión puede estar presente en cualquier cantidad adecuada para potenciar la cohesión de los gránulos de la matriz de liberación enzimática. Los agentes de cohesión adecuados incluyen uno o más de dextrinas, maltodextrinas, almidones, tales como almidón de maíz, harinas, productos celulósicos, hemicelulósicos, y similares. Por ejemplo, el porcentaje de germen de cereal y agente de cohesión en la matriz (o incluyendo la enzima) es del 78% de harina de germen de maíz y el 20% en peso de almidón de maíz.
- 15 Como la matriz de liberación enzimática de la invención está hecha a partir de materiales biodegradables, la matriz puede estar sometida a deterioro, tal como por formación de moho. Para prevenir o inhibir dicha formación de moho, la matriz puede incluir un inhibidor de moho, tal como una sal propionato, que puede estar presente en cualquier cantidad suficiente para inhibir la formación de moho de la matriz de liberación enzimática, proporcionando de este modo una matriz de liberación en una formulación estable que no requiera refrigeración.
- 20 La enzima fitasa contenida en la matriz de liberación enzimática de la invención es una fitasa termotolerante, como se describe en este documento, de modo que resista la inactivación de la fitasa durante la fabricación donde se pueden emplear temperaturas y/o vapor para preparar la matriz de liberación enzimática en forma de gránulos. Durante la digestión del pienso que contenga la matriz de liberación enzimática de la invención, los fluidos digestivos acuosos causarán la liberación de la enzima activa. También pueden incorporarse otros tipos de enzimas termotolerantes y suplementos nutritivos que son termotolerantes en la matriz de liberación para liberar en cualquier tipo de condiciones acuosas.
- 25 Puede aplicarse un recubrimiento a las partículas de la matriz enzimática de la invención para muchos propósitos diferentes, tales como para añadir un aroma o suplemento nutritivo al pienso animal, para retardar la liberación de los suplementos del pienso animal y las enzimas en condiciones gástricas, y similares. O, el recubrimiento puede aplicarse para conseguir un objetivo funcional, por ejemplo, siempre que sea deseable ralentizar la liberación de la enzima desde las partículas de la matriz o para controlar las condiciones en las cuales se liberará la enzima. La composición del material de recubrimiento puede ser tal que se descomponga selectivamente mediante un agente al cual es susceptible (tal como calor, ácido o base, enzimas u otros agentes químicos). Como alternativa, pueden aplicarse consecutivamente dos o más recubrimientos susceptibles a diferentes de dichos agentes de descomposición a las partículas de la matriz.
- 30 Un proceso para preparar una matriz de liberación enzimática comprende proporcionar partículas plurales separadas, de un sustrato basado en cereal en un tamaño de partícula adecuado para su uso como matriz de liberación enzimática, donde las partículas comprenden una enzima fitasa de la invención. El proceso puede incluir compactar o comprimir las partículas de la matriz de liberación enzimática en gránulos, que puede conseguirse por granulación. El inhibidor de moho y el agente de cohesión, cuando se usan, pueden añadirse en cualquier momento adecuado, y pueden mezclarse con el sustrato basado en cereal en las proporciones deseadas antes de la granulación del sustrato basado en cereal. El contenido de humedad en el pienso del molino de sedimentación puede estar en los intervalos expuestos anteriormente con respecto al contenido de humedad en el producto acabado, o de aproximadamente el 14% al 15%, o de aproximadamente el 10% al 20%. Puede añadirse humedad a la materia prima en forma de una preparación acuosa de la enzima para llevar a la materia prima a este contenido de humedad. La temperatura en el molino de sedimentación puede llevarse a aproximadamente 82°C con vapor. El molino de sedimentación puede hacerse funcionar en cualquier condición que confiera suficiente trabajo a la materia prima para proporcionar gránulos. El propio proceso de granulación es un proceso económico para retirar el agua de la composición que contiene enzima.
- 35 El molino de sedimentación se puede hacer funcionar con un troquel de 1/8 pulgadas por 2 pulgadas a 100 lb/min de presión a 82°C para proporcionar gránulos, que después se desmenuzan en un molino de sedimentación desmenuzador para proporcionar partículas plurales separadas que tienen un tamaño de partícula capaz de pasar a través de un tamiz de malla 8 pero reteniéndose en un tamiz de malla 20.
- 40 Las fitasas termotolerantes descritas en este documento pueden tener elevadas temperaturas óptimas y pueden tener una elevada resistencia al calor o tolerancia al calor. Por tanto, las fitasas de la invención pueden realizar
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

reacciones enzimáticas a temperaturas normalmente consideradas por encima de las óptimas. Las fitasas de la invención también pueden realizar reacciones enzimáticas después de exponerse a altas temperaturas (siendo la termotolerancia la capacidad de retener la actividad enzimática a temperaturas en las que la fitasa de tipo silvestre es activa después de exponerse previamente a altas temperaturas, incluso si la alta temperatura puede inactivar o disminuir la actividad de la enzima, véase también la definición de termotolerancia, anteriormente). El gen que codifica la fitasa de acuerdo con la presente invención puede usarse en la preparación de fitasas (por ejemplo, usando la tecnología GSSM y/o TMCA como se describe en este documento) que tienen características diferentes de las de la fitasa de la SEC ID N° 2 (en términos de pH óptimo, temperatura óptima, resistencia al calor, estabilidad a disolventes, actividad específica, afinidad por el sustrato, capacidad de secreción, tasa de traducción, control de la transcripción y similares). Además, los polinucleótidos de la invención pueden emplearse para explorar fitasas variantes preparadas por los métodos descritos en este documento para determinar aquellas que tienen una actividad deseada, tal como termoestabilidad o termotolerancia mejorada o modificada. Por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.830.732, describe un ensayo de exploración para determinar la termotolerancia de una fitasa.

Un ejemplo *in vitro* de dicho ensayo de exploración es el siguiente ensayo para la detección de actividad fitasa: La actividad fitasa puede medirse incubando 150 µl de la preparación enzimática con 600 µl de fitato sódico 2 mM en tampón Tris HCl 100 mM, pH 7,5, suplementado con CaCl₂ 1 mM durante 30 minutos a 37°C. Después de la incubación, la reacción se detiene añadiendo 750 µl de ácido tricloroacético al 5%. El fosfato liberado se midió frente a un patrón fosfato de forma espectrofotométrica a 700 nm después de añadir 1500 µl del reactivo de color (4 volúmenes de molibdato de amonio al 1,5% en ácido sulfúrico al 5,5% y un volumen de sulfato ferroso al 2,7%; Shimizu, 1992). Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar un µmol de Pi por minuto en condiciones de ensayo. La actividad específica puede expresarse en unidades de actividad enzimática por mg de proteína. La enzima de la presente invención tiene actividad enzimática con respecto a la hidrólisis de fitato en inositol y fosfato libre.

Un método para hidrolizar fitato comprende poner en contacto el fitato con una o más de las nuevas moléculas fitasa desveladas en este documento (por ejemplo, proteínas que tienen la(s) modificación (modificaciones) específica(s) de la SEC ID N° 2). Por consiguiente, la invención proporciona un método para catalizar la hidrólisis de fitato en inositol y fosfato libre con liberación de minerales desde el complejo de ácido fítico. El método incluye poner en contacto un sustrato fitato con una cantidad degradante eficaz de una enzima de la invención. La expresión cantidad "degradante eficaz" se refiere a la cantidad de enzima que es necesaria para degradar al menos el 50% del fitato, en comparación con fitato no en contacto con la enzima. Puede degradarse el 80% del fitato.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para hidrolizar enlaces fosfo-mono-éster en fitato. El método incluye administrar una cantidad eficaz de moléculas fitasa de la invención, para producir inositol y fosfato libre. En un aspecto, una cantidad "eficaz" se refiere a la cantidad de enzima que es necesaria para hidrolizar al menos el 50% de los enlaces fosfo-mono-éster, en comparación con fitato no en contacto con la enzima. En un aspecto, se hidroliza al menos el 80% de los enlaces.

En un aspecto particular, cuando se desea, las moléculas fitasa pueden usarse en combinación con otros reactivos, tales como otros catalizadores; para realizar cambios químicos (por ejemplo, hidrólisis) en las moléculas fitato y/o en otras moléculas de la fuente o fuentes de sustrato. De acuerdo con este aspecto, las moléculas fitasa y el reactivo o reactivos adicionales no se inhibirán entre sí. Las moléculas fitasa y el reactivo o reactivos adicionales pueden tener un efecto aditivo global o, como alternativa, las moléculas fitasa y el reactivo o reactivos adicionales pueden tener un efecto sinérgico global.

Fuentes relevantes de las moléculas fitato de sustrato incluyen productos alimenticios, productos alimenticios potenciales, subproductos de productos alimenticios (tanto subproductos *in vitro* como subproductos *in vivo*, por ejemplo, productos de reacción *ex vivo* y productos de excrementos animales), precursores de productos alimenticios, y cualquier otra fuente de material fitato.

En un aspecto no limitante, la fitasa recombinante puede consumirse por organismos y retiene la actividad tras su consumo. En otra ejemplificación, pueden usarse enfoques transgénicos para conseguir la expresión de la fitasa recombinante, por ejemplo, de un modo controlado (están disponibles métodos para controlar la expresión de moléculas transgénicas de modos específicos del tiempo y específicos de tejido).

En un aspecto, la actividad fitasa en el material fuente (por ejemplo, una fuente vegetal transgénica o un hospedador procariota recombinante) puede aumentarse tras el consumo; este aumento en la actividad puede suceder, por ejemplo, tras la conversión de una molécula fitasa parental en pro-forma en una enzima significativamente más activa en una forma más madura, donde dicha conversión puede resultar, por ejemplo, de la ingestión o digestión de la fuente de fitasa. La hidrólisis del sustrato fitato puede suceder en cualquier momento tras el contacto de la fitasa con el fitato; por ejemplo, esto puede suceder antes de la ingestión o después de la ingestión o tanto antes como después de la ingestión del sustrato o la enzima o ambos. Se aprecia adicionalmente que el sustrato de fitato puede ponerse en contacto con - además de la fitasa - uno o más reactivos adicionales, tal como otra enzima, que también puede aplicarse directamente o después de la purificación de su material fuente.

Se aprecia que el material o materiales fuente de fitasa pueden ponerse en contacto directamente con el material o materiales fuente de fitato; por ejemplo, tras moler o masticar *in vitro* o *in vivo* cualquiera de la fuente o fuentes de fitasa y la fuente o fuentes de fitato o ambas. Como alternativa, la enzima fitasa puede purificarse del material o materiales fuente, o el sustrato fitato puede purificarse del material o materiales fuente, o tanto la enzima fitasa como el sustrato fitato pueden purificarse del material o materiales fuente antes del contacto de la enzima fitasa con el sustrato fitato. Se aprecia que puede usarse una combinación de reactivos purificados y no purificados - incluyendo enzima o enzimas o sustrato o sustratos o ambos.

Se aprecia que puede usarse más de un material fuente como fuente de actividad fitasa. Esto es útil como medio para conseguir una liberación temporizada del reactivo o reactivos desde el material o materiales fuente, donde la liberación e diferentes reactivos desde sus materiales fuente sucede de forma diferencial, por ejemplo, según se digieren *in vivo* los materiales fuentes ingeridos o según se procesan los materiales fuente en aplicaciones *in vitro*. El uso de más de un material fuente de actividad fitasa también es útil para obtener actividades fitasa en un intervalo de condiciones y fluctuaciones de las mismas, que pueden encontrarse - tal como un intervalo de valores de pH, temperaturas, salinidades, e intervalos de tiempo - por ejemplo durante diferentes etapas de procesamiento de una aplicación. El uso de diferentes materiales fuente también es útil para obtener diferentes reactivos, como se ejemplifica por una o más formas o isómeros de fitasa y/o fitato y/u otros materiales.

Se aprecia que un único material fuente, tal como una especie vegetal transgénica (o partes vegetales de la misma), puede ser un material fuente tanto de fitasa como de fitato; y que las enzimas y sustratos pueden compartimentarse de forma diferencial dentro de dicha única fuente - por ejemplo, secretado frente a no secretado, expresado de forma diferencial y/o teniendo abundancias diferenciales en diferentes partes de la planta u órganos o tejidos o en compartimentos subcelulares dentro de la misma parte u órgano o tejido vegetal. La purificación de las moléculas fitasa contenidas en la misma puede comprender el aislamiento y/o procesamiento adicional de una o más partes u órganos o tejidos o compartimentos subcelulares vegetales deseables.

Un método para catalizar reacciones *in vivo* y/o *in vitro* usando semillas que contienen cantidades potenciadas de enzimas comprende añadir semillas no de tipo silvestre transgénicas, por ejemplo, en forma molida, a una mezcla de reacción y permitir que las enzimas en las semillas aumenten la velocidad de reacción. Añadiendo directamente las semillas a la mezcla de reacción, el método proporciona una solución al proceso más cara y complicada de extraer y purificar la enzima. También se proporcionan métodos de tratamiento mediante los cuales un organismo que carece de un suministro suficiente de una enzima se le administre la enzima en forma de semillas de una o más especies vegetales, por ejemplo, especies vegetales transgénicas, que contienen cantidades potenciadas de la enzima. Existen detalles adicionales respecto a este enfoque en la bibliografía pública y/o son conocidos para los especialistas en la técnica. En una ejemplificación no limitante particular, dicha bibliografía disponible al público incluye la patente de Estados Unidos Nº 5.543.576 (Van Ooijen et al.) y la patente de Estados Unidos Nº 5.714.474 (Van Ooijen et al.), aunque estas referencias no muestran las moléculas inventivas de la presente solicitud y en su lugar muestran el uso de fitasas fúngicas.

Las presentes moléculas fitasa son útiles para generar formas vivas recombinantes del sistema digestivo (o microbios o flora) y para la administración de dichas formas vivas recombinantes del sistema digestivo a animales. La administración puede realizarse opcionalmente en solitario o en combinación con otras enzimas y/o con otras formas vivas que pueden proporcionar actividad enzimática en un sistema digestivo, donde dichas otras enzimas y dichas formas vivas pueden ser recombinantes o de otro modo. Por ejemplo, la administración puede realizarse en combinación con bacterias xilanolíticas.

Un método para macerar granos de maíz o sorgo es en agua caliente que contiene dióxido de azufre en presencia de una preparación enzimática que comprende una o más enzimas degradantes de fitina, por ejemplo, en una cantidad tal que la fitina presente en el maíz o sorgo se degrade sustancialmente. La preparación enzimática puede comprender fitasa y/o fosfatasa ácida y opcionalmente otras enzimas degradantes de material vegetal. El tiempo de maceración puede ser de 12 a 18 horas. La maceración puede interrumpirse mediante una etapa intermedia de molienda, que reduce el tiempo de maceración. En un aspecto, los granos de maíz o sorgo se maceran en agua caliente que contiene dióxido de azufre en presencia de una preparación enzimática que incluye una o más enzimas degradantes de fitina, tales como fitasa y fosfatasas ácidas, para eliminar o reducir en gran medida el ácido fítico y las sales de ácido fítico. Se encuentran detalles adicionales respecto a este enfoque en la bibliografía pública y/o son conocidos para los especialistas en la técnica, por ejemplo, patente de Estados Unidos Nº 4.914.029, (Caransa et al.) y el documento EP 0321004 (Vaara et al.).

Un método para obtener una masa de pan que tiene propiedades físicas deseables tales como ausencia de adhesividad y elasticidad y un producto de panadería de calidad superior tal como un volumen específico comprende añadir moléculas fitasa a la masa de pan. Las moléculas fitasa de la invención pueden añadirse a una preparación de trabajo de masa de pan que posteriormente se forma y hornea. Se encuentran detalles adicionales al respecto de este enfoque en la bibliografía pública y/o son conocidos para los especialistas en la técnica, por ejemplo, documento JP 03076529 (Hara et al.).

Un método para producir productos alimenticios de soja mejorados combina soja con moléculas fitasa de la

- invención para eliminar el ácido fítico de las semillas de soja, produciendo de este modo productos alimenticios de soja que están mejorados en su suministro de nutrientes traza esenciales para el consumo de organismos y en su digestibilidad de proteínas. En la producción de leche de soja, se añaden moléculas fitasa de la invención o se ponen en contacto con semillas de soja para reducir el contenido de ácido fítico. El proceso puede acelerarse
- 5 agitando la leche de soja junto con la enzima con calentamiento o realizando una reacción tipo mezcla en un recipiente de agitación usando una enzima inmovilizada. Se encuentran detalles adicionales respecto a este enfoque en la bibliografía pública y/o son conocidos para los especialistas en la técnica, por ejemplo, documento JP 59166049 (Kamikubo et al.).
- 10 Un método para producir un producto de mezcla para agua potable o pienso animal en forma fluida comprende usar mezclas minerales y mezclas de vitaminas, y también nuevas moléculas fitasa de la invención. Puede conseguirse una mezcla correctamente dosificada y compuesta de nutrientes necesarios para el consumo del organismo sin ningún riesgo de precipitación y destrucción de minerales/vitaminas importantes, mientras que al mismo tiempo se hace una utilización óptima del fosfato unido a fitina en el pienso. Se encuentran detalles adicionales respecto a este
- 15 enfoque en la bibliografía pública y/o son conocidos para los especialistas en la técnica, por ejemplo, documento EP 0772978 (Bendixen et al.).
- Se aprecia que las moléculas fitasa de la invención también pueden usarse para producir otros productos alimenticios bebibles alcohólicos y no alcohólicos (o bebidas) en base al uso de mohos y/o cereales y/u otras plantas. Estos productos alimenticios bebibles incluyen licores, vinos, bebidas alcohólicas mixtas (por ejemplo, refresco de vino, otros cafés alcohólicos tales como cafés irlandeses, etc.), cervezas, cervezas sin alcohol, zumos, extractos, homogeneizados, y purés. Las moléculas fitasa desveladas en la presente invención pueden usarse para generar versiones transgénicas de mohos y/o cereales y/u otras plantas útiles para la producción de dichos productos alimenticios bebibles, o se usan como ingredientes adicionales en el proceso de fabricación y/o en el
- 20 contenido final de dichos productos alimenticios bebibles. Se encuentran detalles adicionales respecto a este enfoque en la bibliografía pública y/o son conocidos para los especialistas en la técnica.
- 25 Puede obtenerse un sake refinado que tiene una cantidad reducida de fitina y un contenido aumentado de inositol. Dicho sake puede tener - a través efectos directos y/o psicogénicos - una acción preventiva sobre enfermedades hepáticas, arterioesclerosis, y otras enfermedades. Puede producirse un sake a partir de arroz Koji multiplicando un moho de arroz Koji que tiene elevada actividad fitasa como materia prima. Se aprecia que las moléculas fitasa de la presente invención pueden usarse para producir un moho útil con actividad potenciada (por ejemplo, un moho transgénico) y/o pueden añadirse de forma exógena para aumentar los efectos de un moho Koji. La cepa se añade a arroz hervido y se produce Koji mediante un procedimiento convencional. Puede usarse el Koji preparado, se
- 30 prepara arroz completo en dos fases y se produce sake a temperatura constante de sake de 15°C para dar el sake refinado objetivo que tiene una cantidad reducida de fitina y una cantidad aumentada de inositol. Se encuentran detalles adicionales respecto a este enfoque en la bibliografía pública y/o son conocidos para los especialistas en la técnica, por ejemplo, documento JP 06153896 (Soga et al.) y documento JP 06070749 (Soga et al.).
- 35 Puede obtenerse un absorbente capaz de promover la absorción de minerales incluyendo calcio ingerido sin digerirse por los jugos gástricos o jugos intestinales a un bajo coste. El absorbente mineral puede contener un hidrolizado parcial de ácido fítico como ingrediente activo. Un hidrolizado parcial del ácido fítico puede producirse hidrolizando el ácido fítico o sus sales usando nuevas moléculas fitasa de la invención. El tratamiento con las moléculas fitasa puede suceder en solitario y/o en un tratamiento de combinación (para inhibir o aumentar el efecto
- 40 final), y viene seguido por la inhibición de la hidrólisis dentro de un intervalo definido para no liberar todos los radicales fosfato. Se encuentran detalles adicionales respecto a este enfoque en la bibliografía pública y/o son conocidos para los especialistas en la técnica, por ejemplo, documento JP 04270296 (Hoshino).
- 45 Puede proporcionarse un método (y productos a partir del mismo) para producir una composición enzimática que tiene una actividad hidrolizante de fitato aditiva o sinérgica; dicha composición comprende nuevas moléculas fitasa de la invención y uno o más reactivos adicionales para conseguir una composición que es útil para un tratamiento de combinación. El tratamiento de combinación puede conseguirse con el uso de al menos dos fitasas de diferente especificidad de posición, es decir, cualquier combinación de 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, y 6-fitasas. Mediante la combinación de fitasas de diferente especificidad de posición se obtiene un efecto aditivo o sinérgico. Las composiciones tales
- 50 como alimentos y piensos o aditivos de alimentos y piensos que comprenden dichas fitasas en combinación también se incluyen ya que son procesos para su preparación. Se encuentran detalles adicionales respecto a este enfoque en la bibliografía pública y/o son conocidos para los especialistas en la técnica, por ejemplo, documento WO 30681 (Ohmann et al.).
- 55 El tratamiento de combinación puede conseguirse con el uso de una fosfatasa ácida que tiene actividad hidrolizante de fitato a un pH de 2,5, en una baja proporción correspondiente a un perfil de actividad de pH 2,5:5,0 de aproximadamente 0,1:1,0 a 10:1, o de aproximadamente 0,5:1,0 a 5:1, o de aproximadamente 0,8:1,0 a 3:1, o de aproximadamente 0,8:1,0 a 2:1. La composición enzimática puede presentar una superior eficacia hidrolizante de fitato sinérgica a través de tratamiento térmico. La composición enzimática es útil en el tratamiento de productos
- 60 alimenticios (alimentos, piensos y productos forrajeros bebibles y sólidos) para mejorar la hidrólisis de fitato. Se encuentran detalles adicionales o protocolos alternativos respecto a este enfoque en la bibliografía pública y/o son
- 65

conocidos para los especialistas en la técnica, por ejemplo, patente de Estados Unidos N° 5.554.399 (Vanderbeke et al.) y patente de Estados Unidos N° 5.443.979 (Vanderbeke et al.), que muestra el uso de fitasas fúngicas (en particular *Aspergillus*).

5 Una composición puede comprender la enzima de acción sobre fitato nueva en combinación con una o más enzimas adicionales que actúan sobre polisacáridos. Dichos polisacáridos pueden seleccionarse entre el grupo que consiste en arabinanos, fructanos, fucanos, galactanos, galacturonanos, glucanos, mananos, xilanos, levano, fucoidano, carragenina, galactocarolosa, pectina, ácido péctico, amilosa, pululano, glucógeno, amilopectina, celulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, dextrano, pustulano, quitina, agarosa, queratán, condroitina, dermatán, ácido hialurónico, ácido algínico, y polisacáridos que contienen al menos una aldosa, cetosa, ácido o amina seleccionado entre el grupo que consiste en eritrosa, treosa, ribosa, arabinosa, xilosa, lixosa, alosa, altrosa, glucosa, manosa, gulosa, idosa, galactosa, talosa, eritruosa, ribulosa, xilulosa, psicosa, fructosa, sorbosa, tagatosa, ácido glucurónico, ácido glucónico, ácido glucárico, ácido galacturónico, ácido manurónico, glucosamina, galactosamina y ácido neuramínico.

15 Una composición que tiene actividad hidrolizante de fitato sinérgica puede comprender una o más nuevas moléculas fitasa de la invención, una celulasa (también puede incluir una xilanasas), opcionalmente una proteasa, y opcionalmente uno o más reactivos adicionales. Dichos tratamientos de combinación son útiles en el tratamiento de productos alimenticios, productos de madera, tales como productos de papel, y como soluciones y sólidos de limpieza.

20 En un aspecto, las fitasas de la invención son útiles en combinación con componentes de celulosa. Se sabe que las celulasas de muchas bacterias celulolíticas están organizadas en complejos multi-enzimáticos concretos, llamados celulosomas. Las múltiples subunidades de los celulosomas están compuestos numerosos dominios funcionales, que interactúan entre sí y con el sustrato celulósico. Una de esta subunidades comprende una nueva clase distintiva de polipéptido estructurante no catalítico, que integra selectivamente las diversas subunidades de celulasa y xilanasas en el complejo cohesivo. La aplicación inteligente de híbridos de celulosoma y construcciones quiméricas de dominios celulosomáticos debe posibilitar un mejor uso de la biomasa celulósica y puede ofrecer un amplio intervalo de nuevas aplicaciones en investigación, medicina e industria.

30 En un aspecto, las fitasas de la invención son útiles - en solitario o en tratamientos de combinación - en áreas de biopulpeo y bioblanqueo donde se desea una reducción en el uso de agentes químicos dañinos para el medio ambiente tradicionalmente usados en la industria de la pulpa y el papel. El tratamiento con agua residual representa otra vasta área de aplicación donde las enzimas biológicas han demostrado ser eficaces no solamente en la eliminación del color sino también en la bioconversión de sustancias potencialmente nocivas en bioproductos útiles.

35 En un aspecto, las fitasas de la invención son útiles para generar formas vivas que pueden proporcionar al menos una actividad enzimática - en solitario o en tratamientos de combinación - en el tratamiento de sistemas digestivos de organismos. Organismos particularmente relevantes a tratar incluyen organismos no rumiantes, aunque organismos rumiantes también pueden beneficiarse de dicho tratamiento. Específicamente, se aprecia que este enfoque puede realizarse en solitario o en combinación con otras moléculas biológicas (por ejemplo, xilanasas) para generar un hospedador recombinante que exprese una pluralidad de moléculas biológicas. También se aprecia que la administración de las presentes moléculas fitasa y/o hospedadores recombinantes que expresan las presentes moléculas fitasa puede realizarse en solitario o en combinación con otras moléculas biológicas, y/o formas vivas que pueden proporcionar actividades enzimáticas en un sistema digestivo - donde dichas otras enzimas y dichas formas vivas pueden ser recombinantes o de otro modo. Por ejemplo, la administración puede realizarse en combinación con bacterias xilanolíticas.

40 Por ejemplo, además del fitato, muchos organismos también son incapaces de digerir adecuadamente hemicelulosas. Las hemicelulosas o xilanos son componentes principales (35%) de materiales vegetales. Para animales rumiantes, aproximadamente el 50% de los xilanos de la dieta se degradan, pero solamente se degradan cantidades pequeñas de xilanos en el intestino grueso de animales no rumiantes y seres humanos. En el rumen, las especies xilanolíticas principales son *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Bacteroides ruminicola*. En el colon humano, *Bacteroides ovatus* y *Bacteroides fragilis* subespecie "a" son las bacterias xilanolíticas principales. Los xilanos son químicamente complejos, y su degradación requiere múltiples enzimas. La expresión de estas enzimas por las bacterias del intestino varía enormemente entre las especies. *Butyrivibrio fibrisolvens* crea xilanasas extracelulares pero las especies de *Bacteroides* tienen actividad xilanasas unida a las células. La caracterización bioquímica de las enzimas xilanolíticas de las bacterias intestinales no se ha hecho completamente. Se ha clonado un gen de xilosidasa a partir de *B. fibrisolvens*. Los datos de hibridaciones de ADN usando un gen de xilanasas clonado de *B. fibrisolvens* indican que este gen puede estar presente en otras cepas de *B. fibrisolvens*. Una xilanasas clonada de *Bact. ruminicola* se transfirió a y se expresó en grandes cantidades en *Bact. fragilis* y *Bact. uniformis*. Los genes de arabinosidasa y xilosidasa de *Bact. ovatus* se han clonado y ambas actividades parecen estar catalizadas por una única nueva enzima bifuncional.

65 En un aspecto, las fitasas de la invención son útiles para 1) transferirse a un hospedador adecuado (tal como *Bact. fragilis* o *Bact. uniformis*); 2) conseguir una expresión adecuada en un hospedador recombinante resultante; y 3)

administrar dicho hospedador recombinante a organismos para mejorar la capacidad de los organismos tratados de degradar el fitato. La investigación continuada en las áreas genética y bioquímica proporcionará conocimientos y entendimiento para la manipulación de la digestión a nivel intestinal y una comprensión mejorada de la digestión colónica de la fibra.

5 Se encuentran detalles adicionales o protocolos alternativos respecto a este enfoque en la bibliografía pública y/o son conocidos para los especialistas en la técnica, por ejemplo, la invención puede incorporar procedimientos descritos en la patente de Estados Unidos N° 5.624.678 (Bedford et al.), la patente de Estados Unidos N°. 5.683.911 (Bodie et al.), la patente de Estados Unidos N° 5.720.971 (Beauchemin et al.), la patente de Estados Unidos N°
10 5.759.840 (Sung et al.), la patente de Estados Unidos N° 5.770.012 (Cooper), la patente de Estados Unidos N° 5.786.316 (Baeck et al.), la patente de Estados Unidos N° 5.817.500 (Hansen et al.).

15 Las moléculas fitasa de la invención pueden añadirse al reactivo o reactivos desvelados para obtener preparaciones que tienen una actividad fitasa adicional. En un aspecto, el reactivo o reactivos y las moléculas fitasa adicionales no se inhibirán entre sí. En un aspecto, el reactivo o reactivos y las moléculas fitasa adicionales pueden tener un efecto aditivo global. En un aspecto, el reactivo o reactivos y las moléculas fitasa adicionales pueden tener un efecto sinérgico global.

20 La potenciación de la utilización del fósforo de fitato y el tratamiento y prevención de discondroplasia tibial en animales, particularmente aves de corral, puede ser por administración a los animales una composición de pienso que contenga un derivado hidroxilado de vitamina D₃. El derivado de vitamina D₃ puede administrarse a animales en pienso que contenga niveles reducidos de calcio y fósforo para la potenciación de la utilización del fósforo de fitato. Por consiguiente, el derivado de vitamina D₃ puede administrarse en combinación con nuevas moléculas fitasa de la presente invención para la potenciación adicional de la utilización del fósforo de fitato. Se encuentran detalles
25 adicionales o protocolos alternativos respecto a este enfoque en la bibliografía pública y/o son conocidos para los especialistas en la técnica, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.516.525 (Edwards et al.) y la patente de Estados Unidos N° 5.366.736 (Edwards et al.), la patente de Estados Unidos N° 5.316.770 (Edwards et al.).

30 Un producto alimenticio que 1) comprende fitina que se absorba y utilice fácilmente en una forma de inositol en el cuerpo de un organismo; 2) que es capaz de reducir el fósforo en la materia fecal; y 3) que por consiguiente es útil para mejorar la contaminación medioambiental puede comprender una mezcla de un cereal que contenga fitina, un microorganismo productor de ácido láctico, y una nueva molécula fitasa de la invención. En un aspecto, dicho producto alimenticio se produce componiendo un cereal que contenga fitina (por ejemplo, salvado de arroz) con un grupo microbiano eficaz que tenga una propiedad acidófila, que produce ácido láctico, sin producir ácido butílico,
35 libre de patogenicidad, y una fitasa. Ejemplos de un grupo microbiano eficaz incluyen por ejemplo, *Streptomyces sp.* (American Type Culture Collection N°. ATCC 3004) que pertenece al grupo de actinomicetes y *Lactobacillus sp.* (IFO 3070) que pertenece al grupo de lactobacilos.

40 Una cantidad ejemplar de adición de un grupo microbiano eficaz es el 0,2% en peso en términos de peso corporal bacteriano en base a un material de cereal. En un aspecto, la cantidad de la adición de la fitasa es de aproximadamente el 1-2% en peso en base a la fitina en el material de cereal. Se encuentran detalles adicionales o protocolos alternativos respecto a este enfoque en la bibliografía pública y/o son conocidos para los especialistas en la técnica, por ejemplo, el documento JP 08205785 (Akahori et al.).

45 Los métodos para mejorar la solubilidad de proteínas vegetales, para la solubilidad de proteínas en fuentes proteicas vegetales, comprenden tratar la fuente de proteínas vegetales con una cantidad eficaz de una o más enzimas fitasa de la invención y tratar la fuente de proteínas vegetales con una cantidad eficaz de una o más enzimas proteolíticas. Aditivos de pienso animal pueden comprender una fitasa de la invención y una o más enzimas proteolíticas. Se encuentran detalles adicionales o protocolos alternativos respecto a este enfoque en la bibliografía pública y/o son
50 conocidos para los especialistas en la técnica, por ejemplo, el documento EP 0756457 (WO 9528850 A1) (Nielsen y Knap).

55 Un método para producir una preparación proteica vegetal comprende dispersar materiales de fuente de proteínas vegetales en agua a un pH en el intervalo de 2 a 6 y mezclar moléculas fitasa de la invención en el mismo. El extracto ácido que contiene la proteína soluble se separa y se seca para producir una proteína sólida de carácter deseable. También puede usarse una o más proteasas para mejorar las características de la proteína. Se encuentran detalles adicionales o protocolos alternativos respecto a este enfoque en la bibliografía pública y/o son conocidos para los especialistas en la técnica, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 3.966.971.

60 La activación del fósforo inerte en el suelo y/o el compost, puede mejorar la tasa de utilización de un compuesto de nitrógeno. La propagación de mohos patogénicos puede suprimirse añadiendo tres reactivos, fitasa, saponina y quitosana, al compost.

65 Puede tratarse el compost mediante 1) la adición de microorganismos que contengan fitasa en los medios, por ejemplo, hospedadores recombinantes que sobreexpresan las nuevas moléculas fitasa de la invención, por ejemplo, a 100 ml de medio/100 kg de compost húmedo; 2) como alternativa también la adición de una fuente vegetal que

contenga fitasa - tal como salvado de trigo - por ejemplo, a 0,2 a 1 kg/100 kg de compost húmedo; 3) la adición de una fuente que contenga saponina - tal como turba, hojas secas y plantas de yuca - por ejemplo, 0,5 a 3,0 g/kg; 4) la adición de materiales que contengan quitosana - tal como cáscaras pulverizadas de langostinos, cangrejos, etc. - por ejemplo, a 100 a 300g/kg de compost húmedo.

5 Pueden usarse fuentes recombinantes de los tres reactivos, fitasa, saponina, y quitosana. Se encuentran detalles adicionales o protocolos alternativos respecto a este enfoque en la bibliografía pública y/o son conocidos para los especialistas en la técnica, por ejemplo, el documento JP 07277865 (Toya Taisuke).

10 Puede ser ventajoso suministrar y expresar una secuencia de fitasa de la invención de forma local (por ejemplo, dentro de un tejido particular o tipo celular). Por ejemplo, la expresión local de una fitasa o enzima digestiva en el intestino de un animal ayudará a la digestión y captación de, por ejemplo, fitato y fósforo, respectivamente. La secuencia nucleica puede suministrarse directamente a las glándulas, tejido y células salivales y/o a las células epiteliales que revisten el intestino, por ejemplo. Dichos métodos de suministro son conocidos en la técnica e incluyen electroporación, vectores virales y captación directa de ADN. Puede utilizarse cualquier polipéptido que
15 tenga actividad fitasa en los métodos de la invención (por ejemplo, aquellos descritos específicamente en esta subsección 6.3.18, así como aquellos descritos en otras secciones de la invención).

20 Por ejemplo, una construcción de ácido nucleico de la presente invención comprenderá moléculas de ácido nucleico en una forma adecuada para su captación en células diana dentro de un tejido hospedador. Los ácidos nucleicos puede estar en forma de moléculas desnudas de ADN o ARN, donde las moléculas pueden comprender uno o más genes estructurales, uno o más genes reguladores, cadenas antisentido, cadenas capaces de formación de triples hélices, o similares. Habitualmente, la construcción de ácido nucleico incluirá al menos un gen estructural bajo el control transcripcional y traduccional de una región reguladora adecuada. Más habitualmente, las construcciones de
25 ácido nucleico de la presente invención comprenderán ácidos nucleicos incorporados en un vehículo de suministro para mejorar la eficacia de transfección, donde el vehículo de suministro se dispersará dentro de partículas más grandes que comprenden un material excipiente hidrófilo desecado.

30 Uno de dichos vehículos de suministro comprende vectores virales, tales como retrovirus, adenovirus, y virus adeno-asociados, que se han inactivado para evitar la auto-replicación pero que mantienen la capacidad viral nativa de unirse a una célula hospedadora diana, suministrar el material genético al citoplasma de la célula hospedadora diana, y promover la expresión de los genes estructurales u otros genes que se han incorporado en la partícula. Los vectores retrovirales adecuados para la transferencia génica mediada se describen en Kahn et al. (1992) Circ. Res. 71:1508-1517. Un suministro de gen adenoviral adecuado se describe en Rosenfeld et al. (1991) Science 252:431-434. Ambos sistemas de suministro retrovirales y adenovirales se describen en Friedman (1989) Science 244:1275-1281.

40 Un segundo tipo de vehículo de suministro de ácido nucleico comprende vesículas de transfección liposómica, incluyendo construcciones liposómicas tanto aniónicas como catiónicas. El uso de liposomas aniónicos requiere que los ácidos nucleicos se atrapen dentro del liposoma. Los liposomas catiónicos no requieren el atrapamiento de ácido nucleico y en su lugar pueden formarse por mezcla simple de los ácidos nucleicos y los liposomas. Los liposomas catiónicos se unen ávidamente a moléculas de ácido nucleico cargadas negativamente, incluyendo tanto ADN como ARN, para producir complejos que dan una eficacia de transfección razonable en muchos tipos celulares. Véase, Farhood et al. (1992) Biochem. Biophys. Acta. 1111:239-246. Un material ejemplar para formar vesículas liposómicas es lipofectina que está compuesta por una mezcla equimolar de dioleilfosfatidil etanolamina (DOPE) y dioleiloxipropiltriethylamonio (DOTMA), como se describe en Felgner y Ringold (1989) Nature 337:387-388. También es posible combinar estos dos tipos de sistemas de suministro. Por ejemplo, Kahn et al. (1992), *supra.*, muestra que un vector retroviral puede combinarse en una vesícula catiónica de DEAE-dextrano para potenciar adicionalmente la
45 eficacia de transformación. También es posible incorporar proteínas nucleares en vesículas de suministro viral y/o liposómico para mejorar incluso adicionalmente las eficacias de transfección. Véase, Kaneda et al. (1989) Science 243:375-378.

50 Un auxiliar digestivo puede contener una enzima como el único ingrediente activo o en combinación con uno o más agentes diferentes y/o enzimas. El uso de enzimas y otros agentes en auxiliares digestivos de ganado o animales domésticos no solamente mejora la salud y esperanza de vida del animal sino que también ayuda a aumentar la salud del ganado y a la producción de productos alimenticios a partir del ganado.

60 Los piensos para ganado (por ejemplo, ciertos piensos de aves de corral) pueden ser altamente suplementados con numerosos minerales (por ejemplo, fósforo inorgánico), enzimas, factores de crecimiento, fármacos, y otros agentes para su suministro al ganado. Estos suplementos reemplazan muchas de las calorías y nutrientes naturales presentes en los cereales, por ejemplo. Reduciendo o eliminando el suplemento de fósforo inorgánico y otros suplementos (por ejemplo, sales minerales traza, factores de crecimiento, enzimas, antibióticos) del propio pienso, el pienso es capaz de portar más nutrientes y energía. Por consiguiente, la dieta restante contendría más energía útil. Por ejemplo, las dietas de harina de cereales oleaginosos contienen aproximadamente 3.200 kcal de energía metabolizable por kilogramo de dieta, y las sales minerales no aportan energía metabolizable. La eliminación de los
65 minerales no necesarios y la sustitución con cereal por lo tanto aumenta la energía útil en la dieta. Esto se diferencia

sobre el pienso que contiene fitasa habitualmente usado. Por ejemplo, en un aspecto, se usa un material biocompatible que es resistente a la digestión por el tracto gastrointestinal de un organismo.

5 En muchos organismos, incluyendo, por ejemplo, las aves de corral o aves tales como, por ejemplo, gallinas, pavos, gansos, patos, loros, pavos reales, avestruces, faisanes, codornices, pichones, emús, kiwis, somormujos, ninfas, cacatúas, canarios, pingüinos, flamencos, y palomas, el tracto digestivo incluye una molleja que almacena y usa
10 objetos duros biocompatibles (por ejemplo, rocas y conchas de moluscos) para ayudar a la digestión de semillas u otros piensos consumidos por un ave. Un tracto digestivo típico de esta familia general de organismos, incluye el esófago que contiene una bolsa, llamado buche, donde el alimento se almacena durante un breve periodo de
15 tiempo. Desde este buche, el alimento se mueve hacia abajo al estómago verdadero, o *proventriculus*, donde el ácido clorhídrico y la pepsina comienzan el proceso de digestión. A continuación, el alimento se mueve a la molleja, que es de forma oval y de pared gruesa con músculos potentes. La función principal de la molleja es triturar o machacar las partículas de alimento - un proceso que está ayudado por las pequeñas cantidades tragadas por el ave de gravilla o arenilla. Desde la molleja, el alimento se mueve al duodeno. El intestino delgado de las aves es similar al de los mamíferos. Hay dos bolsas ciegas o *ceca*, de aproximadamente 4-6 pulgadas de longitud en la unión del intestino delgado y grueso. El intestino grueso es corto, consistiendo principalmente del recto de aproximadamente 3-4 pulgadas de longitud. El recto se vacía en la *cloaca* y se excretan las heces a través del orificio de descarga.

20 Los objetos duros biocompatibles consumidos (o introducidos de otro modo) y presentes en la molleja proporcionan un vector útil para el suministro de diversos agentes enzimáticos, químicos, terapéuticos y antibióticos. Estas sustancias duras tienen una vida útil de unas pocas horas a unos pocos días y se pasan después de un periodo de tiempo. Los auxiliares dietéticos modificados recubiertos e impregnados (por ejemplo, matriz y membranas impregnadas) pueden suministrar de agentes digestivos o terapéuticos útiles a un organismo. Dichos auxiliares
25 dietéticos incluyen objetos que se ingieren típicamente por un organismo para ayudar a la digestión dentro de la molleja (por ejemplo, rocas o arenilla). Los objetos biocompatibles pueden tener recubierto sobre los mismos o impregnado en los mismos agentes útiles como auxiliar digestivo para un organismo o para el suministro de un agente terapéutico o medicinal o agente químico.

30 Un auxiliar dietético, que tiene una composición biocompatible diseñada para liberar un agente que ayude a la digestión, puede ser diseñado para el consumo oral y la liberación en el tracto digestivo (por ejemplo, la molleja) de un organismo. "Biocompatible" significa que la sustancia, tras el contacto con el organismo hospedador (por ejemplo, un ave), no provoque una respuesta perjudicial suficiente para provocar el rechazo de la sustancia o volver a la sustancia no funcional. Dicha ausencia de funcionalidad puede suceder, por ejemplo, por la formación de una
35 estructura fibrótica alrededor de la sustancia que limite la difusión de los agentes impregnados al organismo hospedador en el mismo o una sustancia que provoque un aumento de la mortalidad o morbilidad del organismo debido a la toxicidad o infección. Una sustancia biocompatible puede ser no biodegradable o biodegradable. La composición biocompatible puede ser resistente a degradación o digestión por el tracto gastrointestinal o tiene la consistencia de una roca o piedra.

40 Un material no biodegradable útil es uno que permita la unión o impregnación de un agente dietético. Dichos materiales no biodegradables no limitantes incluyen, por ejemplo, termoplásticos, tales como acrílicos, modacrílicos, poliamida, policarbonato, poliéster, polietileno, polipropileno, poliestireno, polisulfona, polietersulfona, y fluoruro de polivinilideno. Los elastómeros también son materiales útiles e incluyen, por ejemplo, poliamida, poliéster, polietileno,
45 polipropileno, poliestireno, poliuretano, alcohol polivinílico y silicona (por ejemplo, silicona basada o que contiene sílice). La composición biocompatible puede contener una pluralidad de dichos materiales, que pueden, por ejemplo, mezclarse o estratificarse para formar mezclas, copolímeros o combinaciones de los mismos.

50 Un material "biodegradable" significa que la composición se erosionará o degradará *in vivo* para formar especies químicas más pequeñas. La degradación puede suceder, por ejemplo, por procesos enzimáticos, químicos o físicos. Los materiales biodegradables adecuados para el uso incluyen, aunque sin limitación, poli(lactidas), poli(glicolidas), poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), polianhídridos, poliortoésteres, polieterésteres, policaprolactona, poliestermedias, policarbonato, policianoacrilato, poliuretanos, poliacrilato, y similares. Dichos materiales pueden mezclarse o estratificarse para formar mezclas, copolímeros o combinaciones de los mismos.

55 Pueden darse varias sustancias biocompatibles diferentes al animal e ingerirse secuencialmente, o proporcionarse de otro modo al mismo organismo de forma simultánea, o en diversas combinaciones (por ejemplo, un material antes que el otro). Además, las sustancias biocompatibles pueden diseñarse para el paso lento a través del tracto digestivo. Por ejemplo, las sustancias grandes o grasas tienden a moverse de forma más lenta a través del tracto
60 digestivo, por consiguiente, puede usarse un material biocompatible que tenga un tamaño grande para evitar el paso rápido en el tracto digestivo. Dichas sustancias grandes pueden ser una combinación de sustancias no biodegradables y biodegradables. Por ejemplo, una sustancia pequeña no biodegradable puede estar comprendida por una sustancia biodegradable que se desvela en este documento de modo que durante un periodo de tiempo la parte biodegradable se degradará permitiendo que la parte no biodegradable pasa a través del tracto digestivo.
65 Además, se reconoce que puede proporcionarse cualquiera de varios aromatizantes a una sustancia biocompatible para ayudar a su consumo.

5 Cualquiera de los varios agentes solos o en combinación con otros agentes pueden recubrirse sobre las sustancias biocompatibles, incluyendo polipéptidos (por ejemplo, enzimas, anticuerpos, citoquinas o moléculas pequeñas terapéuticas), y antibióticos, por ejemplo. Ejemplos de agentes útiles particulares se enumeran en la Tabla 1 y 2, a continuación. También se contempla que las células pueden encapsularse en el material biocompatible de la divulgación y usarse para suministrar las enzimas o agentes terapéuticos. Por ejemplo, pueden diseñarse sustancias porosas que tengan poros suficientemente grandes para que las células crezcan en y a través y que estos materiales porosos después puedan llevarse al tracto digestivo. Por ejemplo, la sustancia biocompatible puede comprender una pluralidad de entornos de microflora (por ejemplo, diferente porosidad, pH, etc.) que proporcionan soporte para una pluralidad de tipos celulares. Las células pueden modificarse por ingeniería genética para suministrar un fármaco, enzima o agente químico particular al organismo. Las células pueden ser eucariotas o procariotas.

Tabla 1

Clase de tratamiento	Agente químico	Descripción
Antibióticos	Amoxicilina y su inyección Mastox de combinación (Amoxicilina y Cloxacilina)	Tratamiento Contra Enfermedades Bacterianas Causadas Por Bacterias Gram + y Gram -
	Ampicilina y su inyección Biolox de combinación (Ampicilina y Cloxacilina)	Tratamiento Contra Enfermedades Bacterianas Causadas Por Bacterias Gram + y Gram -.
	Nitrofurazona + Urea Bolo Nefrea	Tratamiento De Infecciones Genitales
	Trimetoprim + Sulfametoxazol Bolo Trizol	Tratamiento De Infecciones Del Tracto Respiratorio, Infecciones Del Tracto Gastrointestinal, Infecciones Urinogenitales.
	Metronidazol y Furazolidona Bolo Metofur	Tratamiento De Enfermedades Bacterianas Y Protozoarias.
	Ftalilsulfatiazol, Pectina y Caolín Pectolina Bolo Suspensión	Tratamiento De Diarrea Bacteriana Y No Específica, Disentería Bacilar Y Diarrea Neonatal En Terneros.
Antihelmínticos	Pomada Germex Ectoparasiticida (Hexacloruro de Gamma Benceno, Hemisulfato de Proflavina y Cetrimida)	Ectoparasiticida y Antiséptico
	Endoparasiticidas > Albendazol y su Combinación Alben (Albendazol) Suspensión (Albendazol 2,5%) Suspensión Plus (Albendazol 5%) Bolo Forte (Albendazol 1,5 g) Comprimido (Albendazol 600 mg) Polvo (Albendazol 5%, 15%)	Prevención Y Tratamiento De Infestaciones De Ascaridiosis, Tenia y Trematodo
	Alpraz (Albendazol y Praziquantel) Comprimido	Prevención Y Tratamiento De Infestaciones De Ascaridiosis, Tenia y Trematodo En Caninos y Felinos.
	Oxiclozanida y su Combinación Clozan (Oxiclozanida) Bolo, Suspensión	Prevención Y Tratamiento De Infestaciones De Trematodo
	Tetzán (Oxiclozanida y Tetramisol Hcl) Bolo, Suspensión	Prevención Y Tratamiento De Infestaciones De Ascaridiosis y Trematodo
	Fluzan (Oxiclozanida y Levamisol Hcl) Bolo, Suspensión	Prevención Y Tratamiento De Infestaciones De Ascaridiosis y Aumento De La Inmunidad
	Levamisol Inyección Nemasol Polvo Wormnil	Prevención Y Tratamiento De Infestaciones De Ascaridiosis y Aumento De La Inmunidad.
	Fenbendazol Fenzol Comprimido (Fenbendazol 150 mg) Bolo (Fenbendazol 1,5 g) Polvo (Fenbendazol 2,5% p/p)	Prevención Y Tratamiento De Infestaciones De Ascaridiosis y Tenia

Clase de tratamiento	Agente químico	Descripción
Tónicos	Complejo de Vitamina B, Aminoácidos y Extracto hepático Inyección Heptogen	Tratamiento de Anorexia, Hepatitis, Debilidad, Convulsiones Neurálgicas Escualidez y Crecimiento Atrofiado.
	Levulinato Cálcico Con Vit.B ₁₂ y Vit.D ₃ Inyección Hylactin	Prevención y tratamiento de hipocalcemia, terapia de apoyo en estados de enfermedad (especialmente hipotermia) y tratamiento de fases tempranas de raquitismo.
Suplementos de pienso animal	Minerales Esenciales, Selenio y Vitamina E Bolo Gynolactin	Tratamiento de Anestro Causado Por Infertilidad y Reproducción Repetida En Animales Lecheros y Caballos.
	Minerales Esenciales, Vitamina E, y Yodo Polvo Hylactin	Infertilidad, Lactación Inapropiada, Inmunidad Disminuida, Crecimiento Atrofiado y Debilidad.
	Electrolitos Esenciales Con Vitamina C Polvo Electra - C	Diarrea, Deshidratación, Previo y después del Transporte, Temperaturas Extremas (Altas o Bajas) y otros Estados de estrés.
	Pyrenox Plus (Diclofenaco Sódico + Paracetamol) Bolo, Inyección.	Tratamiento de Mastitis, Pirexia, Dolor e Inflamación Post Quirúrgica, Prolapso Del Útero, Cojera y Artritis.

Tabla 2. Formulaciones Terapéuticas

Producto	Descripción
Acutrim® (fenilpropanolamina)	Comprimidos supresores del apetito una vez al día.
The Baxter® Infusor	Para suministro intravenoso controlado de anticoagulantes, antibióticos, agentes quimioterapéuticos, y otros fármacos ampliamente usados.
Catapres-TTS® (sistema terapéutico transdérmico de clonidina)	Sistema transdérmico para el tratamiento de hipertensión una vez a la semana.
Covera HS3 (clorhidrato de verapamilo)	Comprimidos de liberación prolongada de aparición prolongada para el tratamiento de hipertensión y angina de pecho una vez al día (COER-24).
DynaCirc CR® (isradipina)	Comprimidos de liberación prolongada para el tratamiento de hipertensión una vez al día.
Efidac 24® (maleato de clorfeniramina)	Comprimidos de liberación prolongada para el alivio de síntomas alérgicos una vez al día.
Estraderm® (sistema transdérmico de estradiol)	Sistema transdérmico para tratar ciertos síntomas postmenopáusicos y prevenir la osteoporosis dos veces a la semana
Glucotrol XL® (glipizida)	Comprimidos de liberación prolongada usados como auxiliar para la dieta para el control de hiperglucemia en pacientes con diabetes mellitus no insulino dependientes una vez al día.
IVOMEK SR® Bolo (ivermectina)	Sistema de suministro de Ruminal para el control estacional de parásitos principales internos y externos en ganado vacuno.
Minipress XL® (prazosina)	Comprimidos de liberación prolongada para el tratamiento de hipertensión una vez al día.
NicoDerm® CQ™ (sistema transdérmico de nicotina)	Sistema transdérmico usado como auxiliar para el abandono del tabaco para el alivio de los síntomas de abstinencia de nicotina una vez al día.
Procardia XL® (nifedipina)	Comprimidos de liberación prolongada para el tratamiento de angina e hipertensión una vez al día.
Sudafed® 24 Horas (pseudoefedrina)	Descongestivo nasal para el alivio de catarros, sinusitis, fiebre del heno y otras alergias respiratorias una vez al día.
Transderm-Nitro® (sistema transdérmico de nitroglicerina)	Sistema transdérmico para la prevención de angina de pecho debido a arteriopatía coronaria una vez al día.
Transderm Scop® (sistema transdérmico de escopolamina)	Sistema transdérmico para la prevención de náuseas y vómitos asociados con mareo por movimiento.

Producto	Descripción
Volmax (albuterol)	Comprimidos de liberación prolongada para el alivio de broncoespasmo en pacientes con enfermedad respiratoria obstructiva reversible.
Actisite®	(clorhidrato de tetraciclina) Fibra periodontal usada como auxiliar para el raspado y pulido para la reducción de la profundidad de las cavidades y el sangrado en la exploración en pacientes con periodontitis adulta.
ALZET®	Bombas osmóticas para investigación en laboratorio.
Amphotec® (complejo de sulfato de colestero y anfotericina B para inyección)	AMPHOTEC® es un tratamiento fungicida para aspergilosis invasiva en pacientes donde la alteración renal o la toxicidad inaceptable impide el uso de anfotericina B en dosis eficaces y en pacientes con aspergilosis invasiva donde ha fallado terapia previa con anfotericina B.
BiCitra® (citrato sódico y ácido cítrico)	Agente alcalinizante usado en aquellas afecciones donde es deseable un mantenimiento a largo plazo de orina alcalina.
Ditropan® (clorhidrato de oxibutinina)	Para el alivio de síntomas de inestabilidad de vejiga asociados con vejiga neurogénica no inhibida o neurogénica refleja (es decir, urgencia, frecuencia, filtrado urinario, incontinencia apremiante, disuria).
Ditropan® XL (clorhidrato de oxibutinina)	Es un comprimido de liberación controlada indicado para el tratamiento de vejiga hiperactiva con síntomas de incontinencia urinaria apremiante, urgencia y frecuencia una vez al día.
DOXIL® (inyección liposómica de doxorubicina HCl)	
Duragesic® (sistema transdérmico de fentanilo) CII	Sistema transdérmico de 72 horas para el tratamiento de dolor crónico en pacientes que requieren analgesia continua con opio por dolor que no puede tratarse por medios más leves tales como combinaciones de acetaminofeno-opioides, analgésicos no esteroideos, o PRN dosificados con opioides de corta acción.
Elmiron® (polisulfato sódico de pentosano)	Indicado para el alivio del dolor de vejiga o malestar asociado con cistitis intersticial.
ENACT AirWatch™	Un sistema de control y tratamiento del asma.
Ethyl® (amifostina)	Indicado para reducir la toxicidad renal acumulativa asociada con administración repetida de cisplatino en pacientes con cáncer avanzado de ovario o cáncer pulmonar no microcítico. Indicado para reducir la incidencia de xerostomía moderada a grave en pacientes que experimentan tratamiento de radiación post-operatorio para cáncer de cabeza y cuello, donde el punto de acceso de la radiación incluye una parte sustancial de las glándulas parótidas.
Mycelex® Trociscos (clotrimazol)	Para el tratamiento local de candidiasis orofaríngea. También indicado profilácticamente para reducir la incidencia de candidiasis orofaríngea en pacientes inmuno-comprometidos por afecciones que incluyen quimioterapia, radioterapia, o terapia con esteroides utilizada en el tratamiento de leucemia, tumores sólidos, o trasplante renal.
Neutra-Phos® (fosfato de potasio y sodio)	Un suplemento dietético/nutricional
PolyCitra® -K Solución Oral y PolyCitra® -K Cristales (citrato potásico y ácido cítrico)	Agente alcalinizante útil en aquellas afecciones donde es deseable un mantenimiento a largo plazo de una orina alcalina, tal como en pacientes con ácido úrico y cálculos de cistina del tracto urinario, especialmente cuando la administración de sales de sodio es indeseable o está contraindicada.
PolyCitra® -K Jarabe y LC (tricitratos)	Agente alcalinizante útil en aquellas afecciones donde es deseable un mantenimiento a largo plazo de una orina alcalina, tal como en pacientes con ácido úrico y cálculos de cistina del tracto urinario.

Producto	Descripción
Progestaseet® (progesterona)	Sistema anticonceptivo de progesterona intrauterina
Testoderm® Testoderm® con Adhesivo y Testoderm® TTS CIII	Sistema transdérmico de testosterona Los productos Testoderm® están indicados para terapia de reemplazo en sujetos masculinos con afecciones asociadas con una deficiencia o ausencia de testosterona endógena: (1) Hipogonadismo primario (congénito o adquirido) o (2) Hipergonadismo hipogonadotrópico (congénito o adquirido).
Viadur™ (implante de acetato de leuprolida)	Implante para el tratamiento paliativo de cáncer de próstata una vez al año

Pueden diseñarse ciertos agentes para que lleguen a ser activos o se lleguen a activar en ciertas condiciones (por ejemplo, a ciertos pH, en presencia de un agente de activación etc.). Además, puede ser ventajoso usar pro-enzimas en las composiciones. Por ejemplo, las pro-enzimas pueden activarse mediante una proteasa (por ejemplo, una proteasa salivar que está presente en el tracto digestivo o se introduce de forma artificial en el tracto digestivo de un organismo). Se contempla que los agentes suministrados mediante las composiciones biocompatibles de la divulgación se activan o inactivan mediante la adición de un agente de activación que puede ingerirse por, o suministrarse de otro modo a, el organismo. Otro mecanismo para el control del agente en el tracto digestivo es un agente sensible al entorno que se active en el compartimento digestivo apropiado. Por ejemplo, un agente puede ser inactivo a bajo pH pero activo pH neutro. Por consiguiente, el agente sería inactivo en el intestino pero activo en el tracto intestinal. Como alternativa, el agente puede llegar a ser activo en respuesta a la presencia de un factor específico de microorganismo (por ejemplo, microorganismos presentes en el intestino). En un aspecto, los beneficios potenciales de la presente invención incluyen, por ejemplo, (1) reducción en o posible eliminación de la necesidad de suplementos minerales (por ejemplo, suplementos de fósforo inorgánico), enzimas, o fármacos terapéuticos para animales (incluyendo peces) del pienso o los cereales diarios aumentando de este modo la cantidad de calorías y nutrientes presentes en el pienso, y (2) salud y crecimiento aumentados de animales domésticos y no domésticos incluyendo, por ejemplo, aves de corral, animales porcinos, bovinos, equinos, caninos, y felinos.

Puede usarse una gran cantidad de enzimas en los métodos y composiciones de la presente invención además de las fitasas de la invención. Estas enzimas incluyen enzimas necesarias para la digestión apropiada de alimentos consumidos, o para el metabolismo, activación o derivación apropiados de agentes químicos, profármacos u otros agentes o compuestos suministrados al animal a través del tracto digestivo. Ejemplos de enzimas que pueden suministrarse o incorporarse en las composiciones de la invención, incluyen, por ejemplo, enzimas potenciadoras del pienso seleccionadas entre el grupo que consiste en α -galactosidasas, β -galactosidasas, en particular lactasas, fitasas, β -glucanasas, en particular endo- β -1,4-glucanasas y endo- β -1,3(4)-glucanasas, celulasas, xilosidasas, galactanasas, en particular arabinogalactano endo-1,4- β -galactosidasas y arabinogalactano endo-1,3- β -galactosidasas, endoglucanasas, en particular endo-1,2- β -glucanasa, endo-1,3- α -glucanasa, y endo-1,3- β -glucanasa, enzimas degradantes de pectina, en particular pectinasas, pectinesterasas, pectina liasas, poligalacturonasas, arabinanasas, ramnogalacturonasas, ramnogalacturonano acetil esterases, ramnogalacturonano- α -ramnosidasa, pectato liasas, y α -galacturonidasas, mananasas, β -manosidasas, manano acetil esterases, xilano acetil esterases, proteasas, xilanasas, arabinoxilanasas y enzimas lipolíticas tales como lipasas, fitasas y cutinasas. Pueden usarse fitasas además de las fitasas que tienen una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID N° 2 en los métodos y composiciones de la invención.

La enzima usada en las composiciones (por ejemplo, una auxiliar dietético) de la presente invención es un enzima fitasa que puede ser estable al calor y ser resistente al calor y cataliza la hidrólisis enzimática de fitato, es decir, la enzima es capaz de renaturalizarse y recuperar la actividad tras un periodo breve (es decir, 5 a 30 segundos), o más largo, por ejemplo, minutos u horas, de exposición a temperaturas por encima de 50°C.

Un "pienso" y un "alimento", respectivamente, significan cualquier dieta natural o artificial, comida o similar o componentes de dichas comidas pretendidos o adecuados para comerse, tomarse, digerirse, por un animal y un ser humano, respectivamente. "Auxiliar dietético", como se usa en este documento, se refiere a, por ejemplo, una composición que contiene agentes que proporcionan un agente terapéutico o digestivo para un animal u organismo. Un "auxiliar dietético" típicamente no es una fuente de ingesta calórica para un organismo, en otras palabras, un auxiliar dietético típicamente no es una fuente de energía para el organismo, sino que es una composición que se toma además del "pienso" o "alimento" típico.

La composición del pienso puede comprender una proteína fitasa recombinante que tiene al menos treinta aminoácidos contiguos de una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2; y un producto alimenticio que contiene fitato. Como sabrán los especialistas en la técnica, dichas composiciones pueden prepararse de varios modos, incluyendo aunque sin limitación, en forma de gránulo con o sin aditivos recubiertos con polímero, en forma granulada, y por secado por pulverización. A modo de ejemplo no limitante, los contenidos de la técnica dirigidos a la preparación de piensos incluyen las publicaciones internacionales N° WO0070034 A1,

WO0100042 A1, WO0104279 A1, WO0125411 A1, WO0125412 A1, y EP 1073342A.

Un agente o enzima (por ejemplo, una fitasa) puede ejercer su efecto *in vitro* o *in vivo*, es decir antes de la ingesta o en el estómago o molleja del organismo, respectivamente. Además es posible una acción combinada.

5 Aunque puede incorporarse cualquier enzima en un auxiliar dietético, se hace referencia en este documento a la fitasa como una ejemplificación de los métodos y composiciones de la invención. Un auxiliar dietético de la invención incluye una fitasa. Generalmente, un auxiliar dietético que contiene una composición de fitasa es líquida o en polvo.

10 Las composiciones líquidas no tienen que contener nada más que la fitasa, preferiblemente en una forma altamente purificada. Habitualmente, sin embargo, también se añade un estabilizante tal como glicerol, sorbitol o monopropilenglicol. La composición líquida también puede comprender otros aditivos, tales como sales, azúcares, conservantes, agentes de ajuste del pH, proteínas, fitato (un sustrato de fitasa). Las composiciones líquidas típicas son pastas espesas de base acuosa u oleosa. Las composiciones líquidas pueden añadirse a una composición
15 biocompatible para ralentizar la liberación. Preferiblemente, la enzima se añade a una composición de auxiliar dietético que es un material biocompatible (por ejemplo, biodegradable o no biodegradable) e incluye la adición de células recombinantes en, por ejemplo, microperlas porosas.

20 Las composiciones en polvo pueden ser composiciones secadas por pulverización, en cuyo caso la composición no tiene que contener nada más que la enzima en una forma en polvo. Habitualmente, sin embargo, las composiciones en polvo son los llamados granulados que pueden mezclarse fácilmente con los componentes de un alimento o pienso, o más preferiblemente, forman un componente de una pre-mezcla. El tamaño de partícula de los granulados enzimáticos preferiblemente es compatible con el de los otros componentes de la mezcla. Esto proporciona un medio seguro y conveniente para incorporar enzimas en el pienso animal. Los granulados pueden ser biocompatible,
25 o pueden ser granulados biocompatible que son no biodegradables.

Los granulados de aglomeración recubiertos por una enzima pueden prepararse usando la técnica de aglomeración en una mezcladora de alta cizalla. Los granulados de absorción se preparan obteniendo núcleos de un material vehículo absorber/recubrirse por la enzima. El material vehículo puede ser un material no biodegradable
30 biocompatible que simula el papel de las piedras o arena en la molleja de un animal. Los materiales de relleno típicos usados en las técnicas de aglomeración incluyen sales, tales como disulfato sódico. Otros rellenos son caolín, talco, silicato de magnesio y aluminio y fibras de celulosa. Opcionalmente, también se incluyen aglutinantes tales como dextrinas en granulados de aglomeración. Los materiales vehículo pueden ser cualquier material biocompatible incluyendo materiales biodegradables y no biodegradables (por ejemplo, rocas, piedras, cerámica,
35 diversos polímeros). Los granulados pueden recubrirse con una mezcla de recubrimiento. Dicha mezcla comprende agentes de recubrimiento, por ejemplo, agentes hidrófobos de recubrimiento, tales como aceite de palma hidrogenado y sebo de vacuno, y si se desea otros aditivos, tales como carbonato de calcio o caolín.

40 Las composiciones de auxiliar dietético (por ejemplo, composiciones de auxiliar dietético de fitasa) pueden contener otros sustituyentes tales como agentes colorantes, compuestos aromáticos, estabilizantes, vitaminas, minerales, otras enzimas potenciadoras del pienso o el alimento etc. Un aditivo usado en una composición de la invención puede comprender uno o más compuestos tales como vitaminas, minerales o enzimas potenciadoras del pienso y vehículos y/o excipientes adecuados.

45 Las composiciones de auxiliar dietético pueden comprender adicionalmente una cantidad eficaz de una o más enzimas potenciadoras del pienso, en particular enzimas potenciadoras del pienso seleccionadas entre el grupo que consiste en α -galactosidasas, β -galactosidasas, en particular lactasas, otras fitasas, β -glucanasas, en particular endo- β -1,4-glucanasas y endo- β -1,3(4)-glucanasas, celulasas, xilosidasas, galactanasas, en particular arabinogalactano endo-1,4- β -galactosidasas y arabinogalactano endo-1,3- β -galactosidasas, endoglucanasas, en
50 particular endo-1,2- β -glucanasa, endo-1,3- α -glucanasa, y endo-1,3- β -glucanasa, enzimas degradantes de pectina, en particular pectinasas, pectinesterasas, pectina liasas, poligalacturonasas, arabinanasas, ramnogalacturonasas, ramnogalacturonano acetil esterasas, ramnogalacturonano- α -ramnosidasas, pectato liasas, y α -galacturonisidasas, mananasas, β -manosidasas, manano acetil esterasas, xilano acetil esterasas, proteasas, xilanasas, arabinoxilanasas y enzimas lipolíticas tales como lipasas, fitasas y cutinasas.

55 El auxiliar dietético para animales de la divulgación se suplementa al animal mono-gástrico antes o simultáneamente con la dieta. Puede suplementarse al animal mono-gástrico simultáneamente con la dieta. Puede añadirse a la dieta en forma de un granulado o un líquido estabilizado.

60 Una cantidad eficaz de una enzima en un tal auxiliar dietético es de aproximadamente 10-20.000; de aproximadamente 10 a 15.000, de aproximadamente 10 a 10.000, de aproximadamente 100 a 5.000, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 2.000 FYT/kg de auxiliar dietético.

65 Ejemplos no limitantes de otros usos específicos de la fitasa de la invención es en el procesamiento de la soja y en la fabricación de inositol o derivados del mismo.

Un método para reducir los niveles de fitato en estiércol animal, implica administrar al animal un auxiliar dietético que contiene una cantidad eficaz de la fitasa de la invención. Como se ha indicado en el inicio de la presente solicitud, un efecto importante de la misma es reducir la contaminación con fosfato del medioambiente.

5 El auxiliar dietético puede ser un vehículo magnético. Por ejemplo, un vehículo magnético que contiene una fitasa distribuida en, sobre o a través de un vehículo magnético (por ejemplo, una perla magnética porosa), puede distribuirse sobre un área de alto contenido en fitato y recogerse mediante imanes después de un periodo de tiempo. Dicha distribución y recogida de perlas reduce la contaminación adicional y permite la reutilización de las perlas. 10 Además, el uso de dichas perlas magnéticas *in vivo* permite la localización del auxiliar dietético en un punto en el tracto digestivo donde, por ejemplo, puede realizarse la actividad fitasa. Por ejemplo, un auxiliar dietético que contiene enzimas digestivas (fitasa) puede localizarse en la molleja del animal por yuxtaposición de un imán cerca de la molleja del animal después de que el animal haya consumido un auxiliar dietético de vehículos magnéticos. El imán puede retirarse después de un periodo de tiempo que permite que el auxiliar dietético pase a través del tracto 15 digestivo. Además, los vehículos magnéticos son adecuados para retirarlos del organismo después del sacrificio o para ayudar a la recogida.

20 Cuando el auxiliar dietético es una partícula porosa, dichas partículas se impregnan típicamente de una sustancia con la cual se desea liberar lentamente para formar una partícula de liberación lenta. Dichas partículas de liberación lenta pueden prepararse no solamente impregnando las partículas porosas con la sustancia que se desea liberar, sino también disolviendo primero la sustancia deseada en la primera fase de dispersión. En este caso, las partículas de liberación lenta preparadas por el método en que la sustancia que tiene que liberarse se disuelve primero en la primera fase de dispersión también están dentro del alcance y espíritu de la invención. Las partículas huecas porosas pueden impregnarse, por ejemplo, con una sustancia de liberación lenta tal como una medicina, agente 25 químico agrícola o enzima. En particular, cuando las partículas huecas porosas impregnadas por una enzima están hechas de polímeros biodegradables, las propias partículas pueden usarse como agente químico agrícola o fertilizante, y no tienen efectos adversos sobre el medioambiente. Las partículas porosas pueden ser de naturaleza magnética.

30 Las partículas huecas porosas pueden usarse como soporte de biorreactor, en particular un soporte enzimático. Por lo tanto, es ventajoso preparar el auxiliar dietético utilizando un método de una liberación lenta, por ejemplo, encapsulando el agente enzimático en una microvesícula, tal como un liposoma, a partir del cual se libera la dosis durante el transcurso de varios días, preferiblemente entre aproximadamente 3 a 20 días. Como alternativa, el agente (por ejemplo, una enzima) puede formularse para liberación lenta, tal como incorporación en un polímero de liberación lenta a partir del cual se libera lentamente la dosificación de agente (por ejemplo, enzima) durante el 35 transcurso de varios días, por ejemplo de 2 a 30 días y puede durar toda la vida del animal.

40 Los liposomas pueden obtenerse de fosfolípidos u otras sustancias lipídicas. Los liposomas se forman por cristales líquidos hidratados mono- o multilamelares que se dispersan en un medio acuoso. Puede usarse cualquier líquido no tóxico, fisiológicamente aceptable y metabolizable capaz de formar liposomas. Las composiciones de la invención en forma de liposoma pueden contener estabilizantes, conservantes, excipientes, y similares además del agente. Algunos lípidos ejemplares son los fosfolípidos y las fosfatidilcolinas (lecitinas), tanto naturales como sintéticos. Los métodos para formar liposomas son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Prescott, Ed., *Methods in Cell Biology*, Volumen XIV, Academic Press, Nueva York, N.Y. (1976), pág. 33 y siguientes. 45

Pueden usarse una fitasa de la invención durante la preparación de preparaciones alimenticias o de pienso o aditivos, es decir, la fitasa ejerce su actividad fitasa durante la fabricación solamente y no es activa en el producto alimenticio o de pienso final. Esto es relevante, por ejemplo, en la preparación y horneado de masas. Por consiguiente, la fitasa o la levadura recombinante que expresa la fitasa puede impregnarse en, sobre o a través de 50 vehículos magnéticos, distribuirse en el medio de la masa o alimento, y recuperarse mediante imanes.

El auxiliar dietético descrito en este documento puede administrarse en solitario a animales en un vehículo biocompatible (por ejemplo, uno biodegradable o no biodegradable) o en combinación con otros agentes aditivos de la digestión. Este puede ser administrado fácilmente como una aliño de cobertura o mezclado directamente en el 55 pienso animal o puede proporcionarse por separado del pienso, mediante dosificación oral diferente, por inyección o por un medio transdérmico o en combinación con otros compuestos comestibles relacionados con el crecimiento, dependiendo las proporciones de cada uno de los compuestos en la combinación del organismo particular o problema que se esté abordando y el grado de respuesta deseado. Debe entenderse que la dosificación dietética específica administrada en cualquier caso dado se ajustará de acuerdo con los compuestos específicos que se estén administrando, el problema a tratar, el estado del sujeto y los demás hechos relevantes que puedan modificar la actividad del ingrediente eficaz o la respuesta del sujeto, como saben bien los especialistas en la técnica. En general, puede emplearse una única dosis diaria o dosificaciones diarias divididas, como se sabe bien en la técnica. 60

Si se administran por separado del pienso animal, las formas del auxiliar dietético pueden prepararse combinándolas con vehículos comestibles farmacéuticamente aceptables no tóxicos para preparar formulaciones de liberación inmediata o liberación lenta, como se sabe bien en la técnica. Dicho vehículos comestibles pueden ser sólidos o 65

líquidos tales como, por ejemplo, almidón de maíz, lactosa, sacarosa, copos de soja, aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo y propilenglicol. Si se usa un vehículo sólido, la forma de dosificación de los compuestos puede ser comprimidos, cápsulas, polvos, trociscos o grageas o aliño de cobertura como formas micro-dispersables. Si se usa un vehículo líquido, la forma de dosificación puede ser cápsulas blandas de gelatina, o jarabe o suspensiones líquidas, emulsiones o soluciones. Las formas de dosificación también pueden contener adyuvantes, tales como agentes conservantes, estabilizantes, humectantes o emulsionantes, promotores de solución, etc. También pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas. Un proceso para preparar un vehículo comestible granulado a alta temperatura para la liberación de enzima cuando se ingiere se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos en trámite junto con la presente N° de serie 09/910.579, presentada el 20 de julio de 2001.

En realizaciones alternativas, las ventajas significativas pueden incluir

- 1) facilidad de fabricación de composiciones biocompatibles cargadas con ingrediente activo;
- 2) versatilidad en lo que se refiere a la clase de polímeros y/o ingredientes activos que pueden utilizarse;
- 3) mayores rendimientos y eficacias de carga; y 4) la provisión de formulaciones de liberación sostenida que liberan agentes activos inactivos y activos *in vivo*, proporcionando de este modo liberación controlada de un agente activo durante un periodo prolongado de tiempo. Una ventaja puede deberse al suministro local del agente en el tracto digestivo (por ejemplo, la molleja) del organismo. La expresión "contenido dentro" se refiere a un método para formular un agente en una composición útil para liberación controlada, durante un periodo prolongado de tiempo del agente.

En las composiciones de liberación sostenida o liberación lenta puede utilizarse una cantidad eficaz de un agente (por ejemplo, una enzima o antibiótico). La liberación sostenida o liberación lenta se refiere a la liberación gradual de un agente desde un material biocompatible, durante un periodo prolongado de tiempo. La liberación sostenida puede ser continua o discontinua, lineal o no lineal, y ésta puede realizarse usando una o más composiciones biodegradables o no biodegradables, cargas de fármaco, selección de excipientes, u otros modificadores. Sin embargo, debe reconocerse que puede ser deseable proporcionar una composición de liberación "rápida" que proporcione una rápida liberación una vez consumida por el organismo. También debe entenderse que "liberación" no indica necesariamente que el agente se libere desde el vehículo biocompatible. En más de un aspecto, la liberación lenta abarca activación lenta o activación continua de un agente presente en la composición biocompatible. Por ejemplo, una fitasa no tiene que liberarse desde la composición biocompatible para ser eficaz. La fitasa puede inmovilizarse en la composición biocompatible.

El pienso animal puede ser cualquier comida orgánica que contenga proteínas normalmente empleada para cumplir las necesidades dietéticas de los animales. Muchas de estas comidas que contienen proteínas están típicamente compuestas principalmente por maíz, harina de soja o una mezcla de maíz/harina de soja. Por ejemplo, los productos típicos disponibles en el mercado para alimentar a aves de corral incluyen Egg Maker Complete, un producto de pienso para aves de corral de Land O'Lakes AG Services, así como Country Game y Turkey Grower un producto de Agwa, Inc. (véase también The Emu Farmer's Handbook de Phillip Minnaar y Maria Minnaar). Estos dos productos disponibles en el mercado son ejemplos típicos de piensos animales con los que el presente auxiliar dietético y/o la enzima fitasa puede incorporarse para reducir o eliminar la cantidad de ingesta suplementaria de fósforo, zinc, manganeso y hierro necesaria en dichas composiciones.

La divulgación proporciona nuevas formulaciones y suplementos dietéticos y aditivos, y métodos para suplementación dietética para ciertas dietas, por ejemplo, la dieta Atkins, dieta vegetariana, dieta macrobiótica, dieta vegana o dietas regionales, por ejemplo, dietas de países en desarrollo. Los alimentos asociados con ciertas dietas electivas, tales como las dietas Atkins, vegetariana, macrobiótica, vegana o regionales (por ejemplo, dietas de países en desarrollo) enfatizan ciertas categorías de alimentos, tales como proteína y grasas, soja, etc., o dependen de cultivos autóctonos, por ejemplo, cereales, arroz, alubias, y similares como contribuyentes sustanciales o únicos para la nutrición de los individuos. Muchos de estos cultivos basados en cereal tienen elevados niveles (3 a 10 veces) de ácido fítico. Los productos alimenticios procesados tales como hidrolizado de proteína de soja y otros parecen retener elevados niveles de ácido fítico y su inclusión como fuente de proteínas a barritas nutritivas, polvos y otros alimentos o suplementos alimenticios e ingredientes aumenta la carga de ácido fítico experimentada por los individuos que practican estas dietas.

Prevención y reversión de la pérdida ósea

La invención también proporciona nuevas formulaciones farmacéuticas y dietéticas a usar como suplementos y aditivos, y métodos para la suplementación dietética, que comprende fitasas de la invención, para individuos predispuestos a pérdida ósea, individuos con pérdida ósea, e individuos con ciertas afecciones médicas, por ejemplo, osteoporosis, caquexia, y tratamientos médicos, tales como quimioterapias, que pueden comprometer la captación o utilización apropiada de nutrientes esenciales. Los métodos y composiciones de la invención pueden usarse en solitario o en combinación con otros suplementos o regímenes de tratamiento, incluyendo con medicaciones y similares. Por ejemplo, las formulaciones, suplementos dietéticos y métodos para suplementación de la dieta pueden administrarse con otros suplementos dietéticos o medicaciones para el tratamiento o prevención de

osteoporosis, por ejemplo, con vitamina D3 y/o calcio (que han demostrado prevenir la pérdida ósea). Una formulación puede comprender una fitasa de la invención, y vitamina D3 y/o calcio. Una formulación que comprende una fitasa de la invención, se utiliza para la prevención de la pérdida ósea o para revertir la pérdida ósea.

5 La formulación puede estar en forma de una composición farmacéutica o puede ser un aditivo para un agente farmacéutico, cualquiera de los cuales puede estar en forma líquida, sólida, en polvo, loción, pulverización o aerosol. Las composiciones farmacéuticas y formulaciones para administración oral pueden formularse usando vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica en dosificaciones apropiadas y adecuadas. Dichos
10 vehículos posibilitan que los agentes farmacéuticos se formen en formas unitarias de dosificación como comprimidos, píldoras, polvos, grageas, cápsulas, líquidos, pastillas, geles, jarabes, pastas espesas, suspensiones, etc., adecuadas para su ingestión por el paciente. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral pueden formularse en forma de un excipiente sólido, opcionalmente triturando una mezcla resultante, y procesando la mezcla de
15 gránulos, después de añadir compuestos adicionales adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de gragea. Los excipientes sólidos adecuados son cargas de carbohidrato o proteína que incluyen, por ejemplo, azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol, o sorbitol; almidón de maíz, trigo, arroz, patata, o otras plantas; celulosa tal como metilcelulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, o carboxi-metilcelulosa sódica; y gomas incluyendo arábica y de tragacanto; y proteínas, por ejemplo, gelatina y colágeno. Pueden añadirse agentes disgregantes o solubilizantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, goma de agar, ácido algínico, o una sal del mismo, tal como alginato sódico.

20 Las suspensiones acuosas pueden comprender una fitasa de la invención en mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Dichos excipientes incluyen un agente de suspensión, tal como carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato sódico, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma arábica, y agentes de dispersión o humectantes tales como un fosfátido de origen natural (por
25 ejemplo, lecitina), un producto de condensación de un óxido de alquileo con un ácido graso (por ejemplo, estearato de polioxietileno), un producto de condensación de óxido de etileno con un alcohol alifático de cadena larga (por ejemplo, heptadecaetileno oxacetanol), un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y un hexitol (por ejemplo, monooleato de polioxietilensorbitol), o un producto de
30 condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de ácido graso y un anhídrido de hexitol (por ejemplo, monooleato de polioxietilensorbitán). La suspensión acuosa también puede contener uno o más conservantes tales como p-hidroxibenzoato de etilo o n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes aromatizantes y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa, aspartamo o sacarina. Las formulaciones pueden ajustarse para la osmolaridad.

35 El régimen de dosificación también tiene en consideración los parámetros farmacocinéticos bien conocidos en la técnica, es decir, la velocidad de absorción de los agente activos, la biodisponibilidad, metabolismo, eliminación, y similares (véase, por ejemplo, Hidalgo-Aragones (1996) J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 58:611-617; Groning (1996) Pharmazie 51:337-341; Fotherby (1996) Contraception 54: 59-69; Johnson (1995) J. Pharm. Sci. 84:1144-1146; Rohatagi (1995) Pharmazie 50:610-613; Brophy (1983) Eur. J. Clin. Pharmacol. 24:103-108; la última edición de
40 Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20^a Ed. Lippincott Williams & Wilkins). El estado de la técnica permite al médico determinar el régimen de dosificación para cada paciente individual, agente activo y enfermedad o afección tratada. Pueden usarse las directrices proporcionadas para composiciones similares usadas como agentes farmacéuticos como una guía para determinar el régimen de dosificación, es decir, programa de dosis y niveles de dosificación, administrados (por ejemplo, reversión de la pérdida ósea o prevención de la pérdida ósea) que son
45 apropiados y correctos.

Suplementos de entrenamiento físico

50 Los nuevos suplementos dietéticos y aditivos pueden comprender fitasas de la invención para individuos que experimentan entrenamiento atlético u otro entrenamiento físico intenso, por ejemplo, entrenamiento para soldados. El entrenamiento atlético y la hiperejercitación pueden agotar los nutrientes esenciales y requerir suplementación dietética. Estas dietas y condiciones tienen en común una ausencia de micronutrientes esenciales tales como metales (K, Ca, Fe, Zn, Mn, Se) e iones (PO₄) necesarios para una nutrición óptima. Las dietas ricas en ácido fólico
55 exacerbaban este problema y también pueden conducir a afecciones tanto crónicas como agudas que resultan de la dependencia voluntaria o económicamente impuesta de dietas ricas en alimentos de alto contenido en ácido fólico.

60 Por ejemplo, los individuos que siguen diversas dietas bajas en carbohidratos ("bajas en carb.") a menudo tienen muchos calambres musculares, por ejemplo, en los músculos de las piernas. El consejo típico para esto es añadir potasio adicional, calcio y otros nutrientes a su dieta. Esto proporciona composiciones para la suplementación dietética, auxiliares dietéticos y suplementos y métodos para la suplementación de la diara para potenciar la nutrición de lo contrario comprometida mediante la movilización de macro y micronutrientes usando suplementación con fitasa a la dieta (incluido el uso de una fitasa de la invención).

65 El uso de una fitasa de la invención puede optimizarse para demostrar los perfiles termolábiles o de estabilidad en pH que harán que sea adecuada para su adición directamente al proceso del alimento y suplemento y/o demostrar la estabilidad y actividad potenciadas en el tracto gastrointestinal humano o animal.

Los nuevos suplementos dietéticos y aditivos pueden comprender fitasas de la invención para individuos que experimentan suplementación mineral. La suplementación mineral para personas con alimentos con alto contenido de ácido fítico realmente puede exacerbar problemas con la disponibilidad de nutrientes. Las referencias de la bibliografía sugieren que complejos de ácido fítico, calcio y zinc son mucho más insolubles que complejos de ácido fítico y calcio. Las personas a menudo toman suplementos multiminerales. La adición de fitasa a un esquema ideado para combinar suplementos minerales en presencia de alimentos con alto contenido de ácido fítico podría hacer que estos suplementos fueran mucho más eficaces.

10 Las composiciones que comprenden una fitasa de la invención, pueden usarse como suplementos o aditivos para

- Programas de pérdida de peso que limitan la ingesta de grupos particulares de alimentos, dietas vegetarianas, macrobióticas o veganas que limitan o evitan la ingesta de carnes, verduras solanáceas, panes, etc. y otras dietas que se centran en la ingesta de frutos secos,
- 15 • Suplemento específico para individuos con dietas bajas en carbohidratos y ricas en alimentos de alto contenido en ácido fítico para aliviar los síntomas fisiológicos basados en una ingesta reducida de minerales,
- Regímenes de entrenamiento atlético que buscan potenciar el rendimiento a través de la ingesta en la dieta, incluyendo regímenes de entrenamiento militar,
- 20 • Dietas hospitalarias adaptadas a necesidades específicas de pacientes con captación comprometida de o con restricciones en grupos de alimentos
- Dietas de cereales o legumbres de bajo contenido en micronutrientes en los países en desarrollo,
- Programas de comidas en los colegios.

25 Los kits que comprenden composiciones de la invención (que comprenden una fitasa de la invención), e instrucciones sobre la incorporación de la composición en estas dietas, pueden comprender cualquier envasado, etiquetado, prospecto y similares.

30 Una fitasa de la invención puede ser formulada para u optimizada para (por ejemplo, secuencia optimizada para) la producción, procesamiento o paso a través del sistema humano o animal, por ejemplo, el tracto digestivo. La enzima fitasa puede optimizarse usando formulaciones alternativas.

35 Como alternativa, una enzima fitasa de la invención puede optimizarse modificando por ingeniería su secuencia, por ejemplo, usando por ejemplo, evolución dirigida, PCR propensa a errores, redistribución, mutagénesis dirigida por oligonucleótido, PCR de ensamblaje, mutagénesis sexual por PCR, mutagénesis *in vivo*, mutagénesis con casete, mutagénesis de conjunto recursivo, mutagénesis de conjunto exponencial, mutagénesis dirigida al sitio, re-ensamblaje por ligamiento, GSSM™ y cualquier combinación de las mismas, para retener la actividad durante el procesamiento, ingestión y en el intestino humano.

40 Las formulaciones dietéticas que comprenden una enzima fitasa de la invención pueden suministrarse de varios modos para proporcionar eficacia dietética. Por ejemplo, pueden usarse tales composiciones:

- Suplementos alimenticios envasados tales como comprimidos masticables o barritas nutritivas,
- Como producto liofilizado disponible para hidratación previa a la ingestión,
 - 45 • Co-ensados con productos dietéticos, por ejemplo, producto de soja envasado o vendidos como una formulación con hidrolizado de proteína de soja y otras fracciones del procesamiento a partir de alimentos completos que se venden como ingredientes para la industria de alimentos procesados,
 - En alimentos precocinados comerciales,
 - Rociado de cereales de desayuno,
 - 50 • Formulaciones administradas por pulverización (por ejemplo, pulverización nasal),
 - Como producto transgénico expresado en cultivos autóctonos, es decir, cereales y legumbres (por ejemplo, como un producto transgénico de un microorganismo, tal como una bacteria)
 - Como un organismo transgénico, por ejemplo, un microorganismo; por ejemplo, un ser humano o animal se alimenta con una bacteria u otro microorganismo capaz de crear (y, en una realización alternativa, secretar) una fitasa recombinante de la invención, después de la ingestión o implante, por ejemplo, en el intestino del ser humano o animal.

60 Los productos que contienen fitasa de la invención pueden marcarse como de nutrientes mejorados, de nutrientes compatibles o destacarse de otro modo para una capacidad de potenciar el rendimiento de los nutrientes y aliviar diversos síntomas asociados con la deficiencia de nutrientes.

65 Los productos que contienen fitasa de la invención se usan para mitigar los efectos anti-nutritivos del fitato, que quela importantes minerales de la dieta tales como zinc, cobre, hierro, magnesio, estaño, y calcio. Por consiguiente, los productos que contienen fitasa de la invención se usan como suplementos dietéticos para prevenir la precipitación de enzimas y proteínas de unión a metales en alimentos ingeridos. En un aspecto, los productos que contienen fitasa de la invención se usan para mitigar los efectos anti-nutritivos del fitato en dietas humanas, en

particular aquellas ricas en legumbres y cereales, para aumentar la biodisponibilidad de minerales. En un aspecto, una fitasa en un suplemento dietético de la invención cataliza la eliminación hidrolítica parcial o completa de ortofosfato de un fitato, donde la hidrólisis completa del fitato provoca la producción de 1 molécula de inositol y 6 moléculas de fosfato inorgánico.

5 Los productos que contienen fitasa de la invención son aplicables a la dieta de seres humanos y numerosos animales, incluyendo aves de corral y peces. Por ejemplo, los productos de suplemento dietético que contienen fitasa y los métodos de suplemento dietético pueden ponerse en práctica con especies comercialmente significativas, por ejemplo, cerdos, ganado vacuno, ovejas, cabras, roedores de laboratorio (ratas, ratones, hámsters y jerbos), animales de pelaje tales como visón y zorro, y animales de zoológico tales como monos y simios, así como mamíferos domésticos tales como gatos y perros. Las especies de aves típicas comercialmente significativas incluyen gallinas, pavos, patos, gansos, faisanes, emús, avestruces, somormujos, kiwis, palomas, loros, ninfas, cacatúas, canarios, pingüinos, flamencos, y codornices. Los peces criados de forma comercial tales como las truchas también se beneficiarían de los auxiliares dietéticos desvelados en este documento. Otros peces que pueden beneficiarse incluyen, por ejemplo, el pescado (especialmente en un entorno de acuario o acuicultura, por ejemplo, pescado tropical), carpa dorada y otras carpas ornamentales, siluro, trucha, salmón, tiburón, raya, platija, lenguado, tilapia, medaka, guppy, molly, platy, cola de espada, pez cebra, y dojo.

20 Los productos que contienen fitasa de la invención también se usan en diversos agares, geles, medios, y soluciones usadas en cultivo tisular y/o celular. Los hidrolizados de soja inconsistentes pueden ser un problema encontrado cuando se usa cultivo tisular y/o celular. En un aspecto, los productos que contienen fitasa de la invención se usan como aditivos de medio de cultivo celular o como tratamientos para, por ejemplo, aumentar la producción de cultivo celular y la regularidad del rendimiento. En un aspecto, la invención proporciona hidrolizado para cultivo celular que comprende fitasas de la invención.

25 Para proporcionar un producto consistente, métodos para preparar hidrolizados, suplementos u otros aditivos para cultivo celular que comprenden fitasas pueden usarse biomarcadores de fitasa. Por ejemplo, el método comprendería "señalar" o "marcar" varias moléculas de fitasa en lotes de hidrolizado, suplemento u otro aditivo, y después mezclar los lotes en el hidrolizado, suplemento u otro aditivo para conseguir un patrón de biomarcador constante. El rendimiento de cultivo con cada lote se mide en uno o más mini-biorreactores y se correlaciona el rendimiento con cada biomarcador y lote. Se hace una mezcla para generar un producto de mayor rendimiento que sea consistente o mejor que el promedio. Puede añadirse tiorredoxina (TRX) para aumentar la biodisponibilidad de muchas proteínas eliminando la estructura secundaria causada por enlaces disulfuro. También puede añadirse proteasas a los hidrolizados, suplementos o aditivos. Las proteasas puede "señalarse" o controlarse su calidad con otros biomarcadores (como con fitasa, como se ha analizado anteriormente) para controlar el proceso de mezclado.

35 Pueden añadirse fitasas a cereales para proporcionar un producto consistente usando un proceso de "señalización" con biomarcador o de control de calidad análogo al descrito anteriormente para dichos hidrolizados, suplementos o aditivos.

40 *Dietas con enzimas potenciadas para aumentar la eficacia y la moral de las tropas*

Los nuevos suplementos dietéticos y aditivos y métodos para suplementación de la dieta pueden comprender fitasas de la invención para dietas con enzimas potenciadas para aumentar la eficacia y la moral de las tropas. Estas composiciones de suplemento dietético funcionan, *in situ*, potenciando la energía, la resistencia y la moral en un formato estable, fácilmente utilizable y deseable limitando al mismo tiempo el derroche de alimentos.

50 Estas composiciones de suplemento dietético y métodos abordan el reto operativo militar que comprende el suministro eficaz de nutrientes y la eficacia asociada en la salud, moral y funcionalidad de los soldados. La invención proporciona enzimas optimizadas para funcionar de forma eficaz en el intestino humano. Estas enzimas pueden potenciar la extracción de nutrientes y la generación de energía así como prolongar el mantenimiento de la suficiencia nutricional y la saciedad individual.

55 Formulaciones, suplementos alimenticios, alimentos, unidades individuales de comida lista para consumir (MRE), bebidas, agentes hidratantes y similares, pueden comprender fitasa, de la invención y otra enzima, por ejemplo, amilasas, xilanasas, proteasas, lipasas o una combinación de las mismas. Cuando se ingieren con alimento, estas enzimas han demostrado potenciar la liberación de nutrientes críticos, por ejemplo, fósforo, metales e iones esenciales, aminoácidos, y azúcares.

60 Además, la co-ingestión de estas enzimas aumenta la mecánica y absorción gastrointestinal despolimerizando la celulosa, hemicelulosa y almidón derivados de plantas. Este documento propone el desarrollo de estas enzimas como suplementos para dietas militares para proporcionar utilización potenciada de los nutrientes para las tropas.

65 El suplemento alimenticio de la invención puede causar la liberación de fosfato esencial desde fitato normalmente anti-nutritivo, derivado de plantas para aumentar la producción de energía procedente de los alimentos y la deposición ósea de CaPO_4 . Las fitasas y otras enzimas potenciales de los suplementos nutritivos pueden soportar el

pH intestinal y las actividades proteasa endógenas.

Los suplementos enzimáticos a raciones, bebidas, alimentos, MRE, agentes hidratantes y similares pueden mejorar significativamente el valor nutricional, la digestibilidad y el contenido de energía de las comidas militares (o cualquier comida, incluyendo comidas para el consumidor general y productos de suplementación dietética) servidas a las tropas en entrenamiento, batalla o cualquier situación estresante. El suplemento puede formularse para facilitar el uso y transporte personal (en o con MRE, agentes hidratantes, etc.). El suplemento enzimático no comprometerá el aspecto, sabor y/o consistencia del alimento. El producto puede mejorar la salud y aumenta la resistencia de las tropas.

Pueden usarse fitasas, incluyendo fitasas de la invención, y en algunos aspectos, enzimas adicionales:

- En suplementos alimenticios o bebibles envasados tales como MRE, raciones, kits de supervivencia, agentes hidratantes, comprimidos masticables o barritas nutritivas;
- Como un producto liofilizado (por ejemplo, un polvo) adecuado para su hidratación antes de la ingestión;
- Co-ensado con productos dietéticos, alimentos, bebidas, por ejemplo, productos de soja procesada o una formulación con hidrolizado de proteína de soja y otras fracciones de procesamiento procedentes de alimentos completos que se venden como ingredientes a la industria de alimentos procesados;
- En alimentos precocinados;
- En rociados para cereales;
- Formulaciones tales como comprimidos, comprimidos recubiertos con película, cápsulas, pulverizaciones y similares.

La suplementación nutritiva que libera rápidamente calorías y macro- y micronutrientes desde las comidas ingeridas. Pueden proporcionarse energía y fuerza corporal a los individuos en situaciones estresantes, por ejemplo, que implican hiperejercitación y periodos discontinuos de privación. Las enzimas son optimizadas y formuladas para funcionar de forma eficaz en el intestino humano manteniendo al mismo tiempo la estabilidad, vida útil y transportabilidad en un entorno deseado, por ejemplo, un entorno militar.

Las formulaciones pueden tener características de sabor, capacidad de disolución, capacidad masticable y eficacia del transporte personal del producto aumentadas. Las composiciones pueden comprender adicionalmente otros componentes, tales como potasio, glucosa, CaCl_2 . El CaCl_2 en la formulación puede combinarse con fosfato liberado y, a su vez, potenciar la deposición ósea y la ganancia de peso. Las composiciones pueden comprender adicionalmente formulaciones de otras enzimas, tales como proteasas, celulasas, hemicelulasas, para la digestión de proteínas, celulosa y hemicelulosa, respectivamente. Estas enzimas pueden mejorar la disponibilidad de proteínas y almidón y aumentar adicionalmente la absorción de hierro a partir de muchos alimentos ricos en hierro.

Las composiciones pueden comprender adicionalmente enzimas para hidrolizar alimentos derivados de material vegetal, que es rico en polímeros basados en glucosa y xilosa, celulosa, hemicelulosa y almidón, así como en polímeros de aminoácidos, proteínas. Las composiciones pueden facilitar la hidrólisis de materiales poliméricos en alimentos; es decir, para facilitar la digestión completa de polímeros en monómeros, por ejemplo, polisacáridos en azúcares monoméricos, o proteínas en restos aminoacídicos. Este permite que un alimento, bebida o ración consiga su valor calórico y nutricional completo. La suplementación enzimática puede comprender el uso de enzimas estable, por ejemplo, hidrolasas de diversos tipos, celulasas, hemicelulasas, amilasas, lipasas, amidasas, proteasas y otras enzimas. Las enzimas usadas en las composiciones y métodos descritos en este documento pueden soportar las condiciones ambientales del intestino, es decir, tienen los estables a bajo pH y en presencia de proteasas gástricas.

Usos industriales de fitasas de la invención.

Reducción de la contaminación con fosfato en el medioambiente

Las composiciones que comprenden fitasas de la invención para añadir a cúmulos residuales o de estiércol para transformar el ácido fítico "medioambiental" cumple el propósito de reducir la contaminación y aumentar la disponibilidad de nutrientes. Las composiciones pueden añadir una fitasa al suelo, masas de agua naturales o artificiales (por ejemplo, lagos, estanques, pozos, balsas de purines, y similares), alcantarillado municipal, cualquier efluente de aguas residuales, y similares. Las composiciones pueden reducir los niveles de fitato en desperdicios o aguas residuales, por ejemplo, un estiércol animal, donde al animal se le administra un auxiliar dietético que contiene una cantidad eficaz de una fitasa de la invención. Las composiciones de la invención pueden reducir la contaminación con fosfato en el medioambiente, usarse en cualquier aplicación que reduzca la contaminación degradando los ácidos fíticos.

Aplicaciones en agricultura y cultivo de plantas

Las composiciones que comprenden fitasas de la invención pueden usarse en métodos para aplicaciones agrícolas u otras aplicaciones de cultivo de plantas, por ejemplo, añadiendo fitasas a fertilizantes o aditivos de alimento

vegetal (por ejemplo, MIRACLEGROW™) para plantas, por ejemplo, plantas de interior. Los usuarios incluyen agricultores orgánicos. Las composiciones pueden usarse para añadir fitasas a cualquier suelo deficiente en fósforo o que necesite fósforo suplementario para un cultivo o aplicación particular. Como la liberación de fósforo ayuda a crecer a las plantas, las composiciones de la invención pueden usarse para añadir fitasas a cualquier cosa que tenga algas o material vegetal en la misma.

Productos de fabricación

Las composiciones que comprenden fitasas de la invención, incluyen las aplicaciones cosméticas, por ejemplo, champúes, lociones o jabones que contienen productos vegetales.

Las composiciones pueden comprender fitasas inmovilizadas de la invención. La fitasa inmovilizada actúa como mecanismo de liberación controlada. Las formulaciones de liberación controlada (liberación temporizada) de fitasas puede ser para la aplicación al suelo, por ejemplo, arcilla, a plantas de interior, etc. Las fitasas pueden inmovilizarse en perlas, por ejemplo, perlas polisorb. Estas perlas pueden suministrarse al suelo, por ejemplo, para plantas agrícolas o de interior. Las formulaciones de liberación controlada (liberación temporizada) de fitasas de la invención pueden usarse en suplementos dietéticos y aditivos.

Biocombustibles y conversión de biomasa

Los métodos para fabricar combustibles, por ejemplo, biocombustibles, comprenden el uso de una o más fitasas de esta invención; incluyendo la provisión de combustibles, por ejemplo, biocombustibles, que comprenden una o más fitasas de esta invención. Los métodos de conversión de biomasa comprenden el uso de una o más fitasas de esta invención.

Las composiciones que comprenden fitasas de la invención pueden usarse en un proceso de fermentación o producción de alcohol, por ejemplo producción de etanol, por ejemplo, para proporcionar alternativas eficaces y sostenibles o complementos al uso de productos basados en el petróleo, por ejemplo, como una mezcla de bioetanol y gasolina.

Los organismos que expresan enzimas de la invención pueden ser para su participación en ciclos químicos que implican la conversión de biomasa natural. Además, la combinación de fitasa (de esta invención) con una o más enzimas degradantes de almidón, tales como amilasa o glucoamilasa, mejora la producción de etanol a partir de almidón. Los métodos para descubrir e implementar la más eficaz de las enzimas posibilitan estos nuevos e importantes procesos industriales de "conversión de biomasa" y energía alternativa.

Conversión de biomasa y producción de biocombustibles limpios

Las fitasas de la invención o anticuerpos, pueden usarse en métodos para el procesamiento de una biomasa o cualquier material lignocelulósico (por ejemplo, cualquier composición que comprenda una celulosa, hemicelulosa y lignina), en un combustible (por ejemplo, un bioetanol, biopropanol, biobutanol, biopropanol, biometanol, biodiesel), además de piensos, alimentos y agentes químicos. Por ejemplo, en un aspecto, una enzima de la invención descompone el ácido fítico no digerible (fitato) en una biomasa (por ejemplo, un material lignocelulósico, un cereal o semilla oleaginosa) para liberar el fósforo digerible; por tanto, en una realización, las fitasas de esta invención se usan para tratar o pretratar una biomasa.

Por tanto, las composiciones de la invención pueden usarse en la producción y/o procesamiento de biocombustibles, por ejemplo, para proporcionar alternativas eficaces y sostenibles y/o complementos al uso de productos basados en el petróleo; por ejemplo, las composiciones de la invención pueden usarse con una mezcla de enzimas para producir un biocombustible - tal como biometanol, bioetanol, biopropanol, biobutanol, biodiesel y similares; que puede añadirse a un combustible diesel, una gasolina, un queroseno y similares. Los organismos que expresan enzimas de la invención pueden ser para su participación en ciclos químicos que implican la conversión de biomasa natural. Las enzimas para la conversión pueden usarse en conjuntos enzimáticos para el procesamiento eficaz de biomasa junto con la despolimerización de polisacáridos, polímeros celulósicos y/o hemicelulósicos en restos metabolizables (por ejemplo, fermentables) de carbono. Los métodos para descubrir e implementar la más eficaz de las enzimas posibilitan estos nuevos e importantes procesos industriales de "conversión de biomasa" y energía alternativa.

Las composiciones de la invención pueden usarse para proporcionar alternativas eficaces y sostenibles o complementos al uso de productos basados en el petróleo, por ejemplo, como una mezcla de bioetanol, biopropanol, biobutanol, biopropanol, biometanol y/o biodiesel y gasolina. Los organismos que expresan enzimas de la invención pueden ser para su participación en ciclos químicos que implican la conversión de biomasa natural. Los métodos para descubrir e implementar la más eficaz de las enzimas posibilitan estos nuevos e importantes procesos industriales de "conversión de biomasa" y energía alternativa.

Las enzimas y mezclas de enzimas o "cócteles" de la invención son para el procesamiento de un material, por ejemplo, un material de biomasa, por ejemplo, composiciones que comprenden un celooligosacárido, un oligómero

de arabinosilano, una lignina, una lignocelulosa, un xilano, un glucano, una celulosa y/o un azúcar fermentable; por ejemplo, incluyendo métodos que comprenden poner en contacto la composición con un polipéptido de la invención, o un polipéptido codificado por un ácido nucleico de la invención, donde opcionalmente el material se obtiene de un cultivo agrícola (por ejemplo, trigo, cebada, patatas, pasto varilla, madera de chopo), es un subproducto de la producción de alimentos o piensos, es un producto residual lignocelulósico, o es un residuo vegetal o un papel residual o producto de papel residual, y opcionalmente el residuo vegetal comprende tallos, hojas, cáscaras, cascarillas, maíz o granos de maíz, rastrojo de maíz, fibra de maíz, heno, paja (por ejemplo, paja de arroz o paja de trigo), bagazo de caña de azúcar, pulpa de remolacha azucarera, pulpa de cítrico, y pieles de cítrico, madera, podas de madera, astillas de madera, pulpa de madera, desperdicios de pulpa, desperdicios de madera, virutas de madera y serrín, desperdicios y desechos de construcción y/o demolición (por ejemplo, madera, virutas de madera y serrín), y opcionalmente los desperdicios del papel comprende papel de fotocopia desechado o usado, papel de impresión en ordenador, papel de cuadernos, papel de bloc de notas, papel de máquina de escribir, periódicos, revistas, cartón y materiales de envasado basados en papel, y materiales de papel reciclado. Además, pueden usarse los desperdicios urbanos, por ejemplo la fracción de papel de los desperdicios sólidos municipales, los desperdicios de madera municipales, y los desperdicios vegetales municipales, junto con otros materiales que contienen azúcar, almidón, y/o celulosa. En realizaciones alternativas, el procesamiento del material, por ejemplo el material de biomasa, genera un bioalcohol, por ejemplo, un biodiesel, bioetanol, biometanol, biobutanol o biopropanol.

Como alternativa, el polipéptido de la invención puede expresarse en un material vegetal de biomasa o la propia materia prima.

Los métodos también incluyen recoger el material lignocelulósico convertido (procesado por enzimas de la invención) y fabricar un combustible (por ejemplo, un bioalcohol, por ejemplo, un bioetanol, biometanol, biobutanol o biopropanol, o biodiesel) por fermentación y/o por síntesis química. Los azúcares producidos pueden fermentarse y/o los productos no fermentables se gasifican.

Los métodos también incluyen convertir algas, aceites vegetales vírgenes, aceites vegetales residuales, mantecas y grasas animales (por ejemplo, sebo, manteca, y grasa amarilla), o aguas residuales, usando enzimas de la invención, y fabricar un combustible (por ejemplo, un bioalcohol, por ejemplo, un bioetanol, biometanol, biobutanol o biopropanol, o biodiesel) por fermentación y/o por síntesis o conversión química.

Las enzimas de la invención (incluyendo, por ejemplo, organismos, tales como microorganismos, por ejemplo, hongos, levaduras o bacterias, que crean y en algunos aspectos secretan enzimas recombinantes de la invención) pueden usarse en o incluirse/integrarse en cualquier fase de cualquier proceso de conversión de biomasa, por ejemplo, en una etapa cualquiera, varias etapas, o incluirse en todas las etapas, o todos los siguientes métodos de procesos de conversión de biomasa, o todas estas alternativas de biocombustible:

- **Combustión directa:** la quema de material por calor directo y es la tecnología de biomasa más simples; puede ser muy económica si la fuente de biomasa está cerca.

- **Pirólisis:** es la degradación térmica de biomasa por calor en ausencia de oxígeno. En un aspecto, la biomasa se calienta a una temperatura entre aproximadamente 800 y 1400 grados Fahrenheit, pero no se introduce oxígeno para soportar la combustión provocando la creación de gas, fuelóleo y carbón vegetal.

- **Gasificación:** puede usarse biomasa para producir metano a través de calentamiento o digestión anaeróbica. Puede obtenerse gas de síntesis, una mezcla de monóxido de carbono e hidrógeno, de biomasa.

- **Gas de vertedero:** se genera por el deterioro (digestión anaeróbica) de basura enterrada en vertederos. Cuando se descomponen los desperdicios orgánicos, genera gas que consiste en aproximadamente un 50% de metano, el componente principal del gas natural.

- **Digestión anaeróbica:** convierte materia orgánica en una mezcla de metano, el componente principal del gas natural, y dióxido de carbono. La biomasa tal como desperdicios acuosos (aguas residuales), estiércol, o desperdicios del procesamiento de alimentos, se mezcla con agua y se suministra a un tanque de digestión son aire.

- **Fermentación**

- **Fermentación alcohólica:** el alcohol combustible se produce convirtiendo masa celulósica y/o almidón en azúcar, fermentando el azúcar en alcohol, después separando la mezcla acuosa de alcohol por destilación. Las materias primas tales como cultivos especializados (por ejemplo, maíz, trigo, cebada, patatas, pasto varilla, *Miscanthus*, madera de chopo), residuos agrícolas y desperdicios (por ejemplo, paja de arroz, rastrojo de maíz, paja de trigo, bagazo de caña de azúcar, cáscaras de arroz, fibra de maíz, pulpa de remolacha azucarera, pulpa de cítrico, y pieles de cítrico), desperdicios forestales (por ejemplo, podas de madera dura y madera blanda, residuos de madera dura y madera blanda de operaciones madereras, virutas de madera, y serrín), desperdicios urbanos (por ejemplo, la fracción de papel de desperdicios sólidos municipales, desperdicios de madera

- 5 municipal, desperdicios vegetales municipales), desperdicios de madera (por ejemplo, desperdicios de aserradero, desperdicios de pasta de papel, desperdicios de construcción, desperdicios de demolición, virutas de madera, y serrín), y papel residual u otros materiales que contienen azúcar, almidón, y/o celulosa pueden convertirse en azúcares y después en alcohol por fermentación con levaduras. Como alternativa, los materiales que contienen azúcares pueden convertirse directamente en alcohol por fermentación.
- 10 ■ **Transesterificación:** una reacción ejemplar para convertir aceite en biodiesel se llama transesterificación. El proceso de transesterificación hace reaccionar un alcohol (como metanol) con los aceites triglicéridos contenidos en aceites vegetales, grasas animales, o grasas recicladas, formando ésteres de alquilo de ácidos grasos (biodiesel) y glicerina. La reacción requiere calor y un catalizador de base fuerte, tal como hidróxido sódico o hidróxido potásico.
- 15 ■ **Biodiesel:** El biodiesel es una mezcla de ésteres de alquilo de ácidos grasos creada a partir de aceites vegetales, grasas animales o grasas recicladas. El biodiesel puede usarse como combustible para vehículos en su forma pura, pero habitualmente se usa como aditivo de gasóleo para reducir los niveles de particulados, monóxido de carbono, hidrocarburos y tóxicos del aire procedentes de vehículos que usan gasóleo.
- 20 ■ **Hidrólisis:** incluye la hidrólisis de un compuesto, por ejemplo, una biomasa, tal como un material lignocelulósico, catalizada usando una enzima de la presente invención.
- 25 ■ **Cogeneración:** es la producción simultánea de más de una forma de energía usando un único combustible e instalación. En un aspecto, la cogeneración de biomasa tiene mayor crecimiento potencial que la generación de biomasa solamente porque la cogeneración produce tanto calor como electricidad.
- 30 En un aspecto, los polipéptidos de la invención pueden usarse junto con otras enzimas, por ejemplo, hidrolasas o enzimas que tienen actividad celulolítica, por ejemplo, una glucanasa, endoglucanasa, manasa y/u otra enzima, para generar un combustible tal como un bioalcohol, por ejemplo, un bioetanol, biometanol, biobutanol o biopropanol, o biodiesel, a partir de cualquier material orgánico, por ejemplo, una biomasa, tal como composiciones derivadas de plantas y animales, incluyendo cualquier cultivo agrícola o otra materia prima renovable, un residuo agrícola o un desperdicio animal, los componentes orgánicos de desperdicios municipales e industriales, o desperdicios o desechos de construcción o demolición, o microorganismos tales como algas o levaduras.
- 35 En un aspecto, los polipéptidos de la invención se usan en procesos para convertir biomasa lignocelulósica en un combustible (por ejemplo, un bioalcohol, por ejemplo, un bioetanol, biometanol, biobutanol o biopropanol, o biodiesel), o se usan de otro modo en procesos para hidrolizar o digerir biomateriales de modo que puedan usarse como combustible (por ejemplo, un bioalcohol, por ejemplo, un bioetanol, biometanol, biobutanol o biopropanol, o biodiesel), o para hacer más fácil procesar la biomasa en un combustible.
- 40 En un aspecto alternativo, los polipéptidos de la invención, incluyendo la mezcla de enzimas o "cócteles" de la invención, se usan en procesos para un proceso de transesterificación que hacer reaccionar un alcohol (como etanol, propanol, butanol, propanol, metanol) con un aceite triglicérido contenido en un aceite vegetal, grasa animal o grasas recicladas, formando ésteres de alquilo de ácidos grasos (biodiesel) y glicerina. En un aspecto, el biodiesel se fabrica a partir de aceite de soja o aceites de cocina reciclados. También pueden usarse grasas animales, otros aceites vegetales, y otros aceites reciclados para producir biodiesel, dependiendo de sus costes y disponibilidad. En otro aspecto, se usan mezclas de todos los tipos de grasas y aceites para producir un combustible biodiesel de la invención.
- 45 Las enzimas de la invención, incluyendo la mezcla de enzimas o "cócteles" de la invención, también pueden usarse en el refinado de glicerina. El subproducto glicerina contiene catalizador sin reaccionar y jabones que se neutralizan con un ácido. El agua y el alcohol se retiran para producir glicerina sin procesar del 50% al 80%. Los contaminantes restantes incluyen grasas y aceites sin reaccionar, que pueden procesarse usando los polipéptidos de la invención. En plantas grandes de biodiesel de la invención, la glicerina puede purificarse adicionalmente, por ejemplo, hasta una pureza del 99% o mayor, para la industria farmacéutica y cosmética.
- 50 Los combustibles (incluyendo bioalcoholes tales como bioetanoles, biometanoles, biobutanoles o biopropanoles, o biodieseles) preparados usando los polipéptidos de la invención, incluyendo la mezcla de enzimas o "cócteles" de la invención, pueden usarse con oxigenados combustibles para mejorar las características de combustión. Añadiendo oxígeno se produce una combustión más completa, que reduce las emisiones de monóxido de carbono. Esto es otro beneficio medioambiental de reemplazar los combustibles del petróleo con biocombustibles (por ejemplo, un combustible de la invención). Un biocombustible preparado usando las composiciones y/o los métodos de esta invención puede mezclarse con gasolina para formar una mezcla E10 (aproximadamente el 5% al 10% de etanol y aproximadamente el 90% al 95% de gasolina), pero puede usarse en concentraciones mayores tales como E85 o en su forma pura. Un biocombustible preparado usando las composiciones y/o métodos de esta invención puede mezclarse con gasóleo para formar una mezcla B20 (20% de biodiesel y 80% de gasóleo), aunque pueden usarse otros niveles de mezcla de hasta B 100 (biodiesel puro).
- 65

Pueden usarse enzimas de esta invención para fabricar biocombustibles (incluyendo bioalcoholes tales como bioetanoles, biometanoles, biobutanoles o biopropanoles, o biodieseles) a partir de composiciones que comprenden una biomasa, por ejemplo, una fuente derivada de plantas, tal como una biomasa lignocelulósica. El material de biomasa puede obtenerse de cultivos agrícolas, como subproducto de la producción de alimentos o piensos, o como productos residuales, incluyendo productos residuales lignocelulósicos, tales como residuos vegetales, papel residual o desperdicios o desechos de construcción y/o demolición. Ejemplos de fuentes vegetales adecuadas o residuos vegetales para el tratamiento con polipéptidos de la invención incluyen kelp, algas, cereales, semillas, tallos, hojas, cáscaras, cascarillas, granos de maíz, rastrojo de maíz, paja, caña de azúcar, bagazo de caña de azúcar, herbáceas (por ejemplo, hierba india, tal como *Sorghastrum nutans*; o, pasto varilla, por ejemplo, especies *Panicum*, tales como *Panicum virgatum*), y similares, así como madera, astillas de madera, pulpa de madera, y serrín. Ejemplos de desperdicios de papel adecuados para el tratamiento con polipéptidos de la invención incluyen papel de fotocopia desechado, papel de impresión en ordenador, papel de cuadernos, papel de bloc de notas, papel de máquina de escribir, y similares, así como periódicos, revistas, cartón, y materiales de envasado basados en papel. Ejemplos de desperdicios y desechos de construcción y demolición incluyen madera, trozos de madera, virutas de madera y serrín.

En una realización, las enzimas, incluyendo la mezcla de enzimas o "cócteles" de la invención pueden usarse junto con medios más "tradicionales" para fabricar etanol, metanol, propanol, butanol, propanol y/o diesel a partir de biomasa, por ejemplo, como métodos que comprenden hidrolizar materiales lignocelulósicos sometiendo material lignocelulósico seco en un reactor a un catalizador comprendido por una solución diluida de un ácido fuerte y una sal metálica; esto puede disminuir la energía de activación, o la temperatura, de la hidrólisis de celulosa para obtener producciones mayores de azúcar; véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 6.660.506 y 6.423.145.

Otro método ejemplar que incorpora el uso de enzimas de la invención, incluyendo la mezcla de enzimas o "cócteles" de la invención, comprende hidrolizar una biomasa, incluyendo cualquier material lignocelulósico, por ejemplo, que contenga hemicelulosa, celulosa y lignina, o cualquier otro polisacárido que pueda hidrolizarse, sometiendo el material a una etapa de hidrólisis de primera fase en un medio acuoso a una temperatura y una presión elegidas para realizar principalmente la despolimerización de la hemicelulosa sin despolimerización importante de celulosa en glucosa. Esta etapa produce una pasta espesa en que la fase acuosa líquida contiene monosacáridos disueltos resultantes de la despolimerización de hemicelulosa y una fase sólida que contiene celulosa y lignina. Una etapa de hidrólisis de segunda fase puede comprender condiciones tales que al menos una parte importante de la celulosa se despolimerice, produciendo dicha etapa una fase acuosa líquida que contiene productos de despolimerización disueltos/solubles de celulosa. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.536.325. Las enzimas de la invención (incluyendo las mezclas de la invención, o "cócteles" de enzimas) pueden añadirse en cualquier fase de este proceso ejemplar.

Otro método ejemplar que incorpora el uso de enzimas de la invención, incluyendo la mezcla de enzimas o "cócteles" de la invención, comprende procesar un material de biomasa que contiene lignocelulosa mediante una o más fases de hidrólisis con ácido diluido con ácido fuerte del 0,4% al 2%; y tratar un componente lignocelulósico sólido sin tratar del material de biomasa hidrolizado con ácido por deslignificación alcalina para producir precursores para termoplásticos biodegradables y derivados. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 6.409.841. Las enzimas de la invención pueden añadirse en cualquier fase de este proceso ejemplar.

Otro método ejemplar que incorpora el uso de enzimas de la invención, incluyendo la mezcla de enzimas o "cócteles" de la invención, comprende prehidrolizar material lignocelulósico en un reactor de prehidrólisis; añadir un líquido ácido al material lignocelulósico sólido para crear una mezcla; calentar la mezcla hasta la temperatura de reacción; mantener la temperatura de la reacción durante un tiempo suficiente para fraccionar el material lignocelulósico en una parte solubilizada que contenga al menos aproximadamente el 20% de la lignina del material lignocelulósico y una fracción sólida que contenga celulosa; retirar una parte solubilizada de la fracción sólida mientras está a o cerca de la temperatura de reacción donde la celulosa en la fracción sólida se vuelve más susceptible a digestión enzimática; y recuperar una parte solubilizada. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.705.369. Las enzimas de la invención pueden añadirse en cualquier fase de este proceso ejemplar.

Las composiciones combustibles para motores (por ejemplo, para motores de encendido por chispa) basadas en hidrocarburos líquidos mezclados con un alcohol de calidad combustible pueden fabricarse mediante el uso de una enzima de la invención. En un aspecto, los combustibles fabricados mediante el uso de una enzima de la invención comprenden, por ejemplo, mezclas de gas de carbón líquido - o gas natural líquido-etanol. En un aspecto, un co-disolvente es 2-metiltetrahydrofurano (MTHF) obtenido de biomasa. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 6.712.866.

La degradación enzimática de lignocelulosa, por ejemplo, para la producción de biocombustibles (incluyendo bioalcoholes tales como bioetanoles, biometanoles, biobutanoles o biopropanoles, o biodieseles) a partir de material lignocelulósico, también pueden comprender el uso de tratamiento ultrasónico del material de biomasa; véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 6.333.181.

Los biocombustibles (incluyendo bioalcoholes tales como bioetanoles, biometanoles, biobutanoles o biopropanoles,

o biodieseles) a partir de sustrato celulósico pueden proporcionarse una mezcla de reacción en forma de una pasta espesa que comprende sustrato celulósico, una enzima de esta invención y un agente de fermentación (por ejemplo, dentro de un vaso de reacción, tal como un biorreactor alimentado con sólidos de forma semi-continua), y la mezcla de reacción se hace reaccionar en condiciones suficientes para iniciar y mantener una reacción de fermentación (como se describe, por ejemplo, en la solicitud de patente de Estados Unidos N° 20060014260). Los cálculos experimentales o teóricos pueden determinar una frecuencia óptima de suministro. Pueden proporcionarse cantidades adicionales del sustrato celulósico y la enzima en el recipiente de reacción a un intervalo o intervalos de acuerdo con la frecuencia optimizada de suministro.

Un proceso para fabricar biocombustibles (incluyendo bioalcoholes tales como bioetanol, biometanol, biobutanol o biopropanol, o biodieseles) se describe en las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos N° 20050069998; 20020164730; y comprende las fases de moler la biomasa lignocelulósica (por ejemplo, a un tamaño de 15-30 mm), someter el producto obtenido a pretratamiento con explosión de vapor (por ejemplo, a una temperatura de 190-230°C) durante entre 1 y 10 minutos en un reactor; recoger el material pretratado en un ciclón o producto relacionado de fabricación; y separar las fracciones líquida y sólida por filtración en una prensa de filtro, introducir la fracción sólida en un depósito de fermentación y añadir una o más enzimas de la invención, (por ejemplo, disuelta en tampón citrato pH 4,8).

Otro proceso para fabricar biocombustibles (incluyendo bioalcoholes tales como bioetanol, biometanol, biobutanol o biopropanol, o biodieseles) que comprenden bioetanol, biometanol, biobutanol o biopropanol usando enzimas de la invención comprende pretratar un material de partida que comprende una materia prima lignocelulósica que comprende al menos hemicelulosa y celulosa. El material de partida puede comprender patatas, soja (colza), cebada, centeno, maíz, avena, trigo, remolacha o caña de azúcar o un componente o desperdicio o subproducto de la producción de alimentos o piensos. El material de partida ("materia prima") se hace reaccionar a condiciones que alteran la estructura fibrosa de la planta para realizar al menos una hidrólisis parcial de la hemicelulosa y celulosa. Las condiciones de alteración pueden comprender, por ejemplo, someter el material de partida a una temperatura promedio de 180°C a 270°C a pH 0,5 a 2,5 durante un periodo de aproximadamente 5 segundos a 60 minutos; o, temperatura de 220°C a 270°C, a pH 0,5 a 2,5 durante un periodo de 5 segundos a 120 segundos, o equivalente. Esto genera una materia prima con accesibilidad aumentada para digerirse por una enzima de la invención. Patente de Estados Unidos N° 6.090.595.

Condiciones ejemplares para usar enzimas de la invención en la hidrólisis de material lignocelulósico incluyen reacciones a temperaturas entre aproximadamente 30°C y 48°C, y/o un pH entre aproximadamente 4,0 y 6,0. Otras condiciones ejemplares incluyen una temperatura entre aproximadamente 30°C y 60°C y un pH entre aproximadamente 4,0 y 8,0.

Pueden usarse glucanasas, (o celulasas), mananasas, xilanasas, amilasas, xantanasas y/o glicosidasas, por ejemplo, celobiohidrolasas, mananasas y/o beta-glucosidasas en la conversión de biomasa en combustibles, y en la producción de etanol, por ejemplo, como se describe en las solicitudes PCT N° WO0043496 y WO8100857. Pueden usarse glucanasas (o celulasas), mananasas, xilanasas, amilasas, xantanasas y/o glicosidasas, por ejemplo, celobiohidrolasas, mananasas y/o beta-glucosidasas, en combinación con fitasa de la invención para producir azúcares fermentables y biomasa que contenga glucano que puede convertirse en etanol combustible. Pueden usarse amilasas, glucoamilasas, pulanasas, glucoisomerasa, alfa-glucosidasa, y similares en combinación con fitasa de la invención para convertir almidón en azúcares fermentables o etanol. Por favor, véase la solicitud PCT N° WO2005/096804.

Procesamiento de granos deshidratados de destilería

Las enzimas de la invención pueden usarse para tratar/procesar "solubles deshidratados de destilería (DDS)", "granos deshidratados de destilería (DDS)", "solubles condensados de destilería (CDS)", "granos húmedos de destilería (DWG)", y "granos deshidratados de destilería con solubles (DDGS)"; los granos deshidratados de destilería pueden ser un subproducto de cereal de un proceso de destilación, y pueden incluir solubles. Estos procesos pueden comprender subproductos vegetales de molienda en seco, por ejemplo para aplicaciones de piensos, por ejemplo, para aves de corral, gana bovino, cerdos y otros animales domésticos. Por tanto, las enzimas de la invención pueden usarse para tratar/procesar granos, por ejemplo, cereales, que son subproductos de cualquier proceso de destilación, incluyendo procesos que usan cualquier fuente de cereal, por ejemplo, las fuentes tradicionales de elaboración cervecera, o como alternativa, de una planta productora de etanol (fábrica, molino o similar). Las enzimas de la invención pueden usarse para tratar/procesar masas de deshidratación de destilerías; esta masa posteriormente puede usarse para una diversidad de propósitos, por ejemplo, como forraje para ganado, especialmente rumiantes.

Las fitasas de esta invención pueden usarse en solitario o con otras enzimas para procesar "solubles deshidratados de destilería (DDS)", "granos deshidratados de destilería (DDS)", "solubles condensados de destilería (CDS)", "granos húmedos de destilería (DWG)", y "granos deshidratados de destilería con solubles (DDGS)". Por ejemplo, las fitasas de esta invención pueden usarse en cualquier etapa de un proceso de productos alcohólicos como se ilustra en la Figura 10. Las fitasas de esta invención pueden usarse para aumentar la biodisponibilidad de fósforo en

cualquier biocombustible, o biocombustible potencial, incluyendo el fósforo hallado en "solubles deshidratados de destilería (DDS)", "granos deshidratados de destilería (DDS)", "solubles condensados de destilería (CDS)", "granos húmedos de destilería (DWG)", y "granos deshidratados de destilería con solubles (DDGS)" (véase, por ejemplo, C. Martínez Amezcua, 2004 Poultry Science 83:971-976).

5

Producción de licores o alcohol bebible

Las fitasas de esta invención también pueden usarse en el procesamiento de granos deshidratados de destilería para la producción de alcohol - alcohol como en "licores", por ejemplo, la producción de cerveza o whiskey (además del uso en el procesamiento de biomasa para fabricar biocombustibles). Las fitasas de esta invención pueden usarse en plantas de etanol, por ejemplo para procesar cereales tales como maíz. Los granos deshidratados de destilería pueden prepararse moliendo primero un cereal en grano (por ejemplo, maíz) hasta una consistencia gruesa y añadiendo agua caliente. Después de un periodo de refrigeración, se añaden levaduras y la mezcla fermenta durante varios días a una semana. Los sólidos que quedan después de la fermentación son los granos de destilería. Las fitasas de esta invención pueden usarse en cualquier etapa de este proceso.

10

15

Formulaciones

La invención proporciona nuevas formulaciones que comprenden fitasas, por ejemplo, como las descritas en este documento, y formulaciones para fitasas, incluyendo formulaciones que incluyen las nuevas fitasas de la invención. Las fitasas de la invención pueden usarse o formularse en solitario o como mezcla de fitasas o fitasas y otras enzimas tales como xilanasas, celulasas, proteasas, lipasas, amilasas, o enzimas redox tales como lacasas, peroxidases, catalasas, oxidasas, o reductasas. Pueden usarse formuladas en forma sólida tal como un polvo, una preparación liofilizada, un gránulo, un comprimido, una barrita, un cristal, una cápsula, una píldora, una microesfera, o en forma líquida tal como en una solución acuosa, un aerosol, un gel, una pasta, una pasta espesa, una emulsión acuosa/oleosa, una crema, una cápsula, o en una suspensión vesicular o micelar. Las formulaciones puede comprender cualquiera o una combinación de los siguientes ingredientes: polioles tales como un polietilenglicol, un alcohol polivinílico, un glicerol, un azúcar tal como una sacarosa, un sorbitol, una trehalosa, una glucosa, una fructosa, una maltosa, una manosa, un agente gelificante tal como una goma guar, una carragenina, un alginato, un dextrano, un derivado celulósico, una pectina, una sal tal como un cloruro sódico, un sulfato sódico, un sulfato de amonio, un cloruro de calcio, un cloruro de magnesio, un cloruro de zinc, un sulfato de zinc, una sal de un ácido graso y un derivado de ácido graso, un quelante de metal tal como EDTA, EGTA, un citrato sódico, un agente antimicrobiano tal como un ácido graso o un derivado de ácido graso, un parabeno, un sorbato, un benzoato, un compuesto de modulación adicional para bloquear el impacto de una enzima tal como una proteasa, un proteína voluminosa tal como BSA, un hidrolizado de trigo, un compuesto de borato, un aminoácido o un péptido, un compuesto modulador apropiado del pH o la temperatura, un emulsionante tal como un detergente no iónico y/o uno iónico, un agente redox tal como cistina/cisteína, glutatión, glutatión oxidado, un compuesto reducido o antioxidante tal como ácido ascórbico, una cera o aceite, o un dispersante. También puede usarse reticulación y modificación de proteínas tal como pegilación, modificación con ácidos grasos, glucosilación para mejorar la estabilidad de la enzima.

20

25

30

35

40

Medición de los parámetros metabólicos

La evolución de células completas, o la modificación por ingeniería de células completas, de una célula para desarrollar una nueva cepa celular que tenga un nuevo fenotipo puede ser mediante la modificación la composición genética de la célula, donde la composición genética se modifica por adición a la célula de un ácido nucleico de la invención. Para detectar el nuevo fenotipo, se controla al menos un parámetro metabólico de una célula modificada en la célula en a "tiempo real" o en un tramo de tiempo "en línea". En un aspecto, se controla una pluralidad de células, tal como un cultivo celular, a "tiempo real" o "en línea". En un aspecto, se controla una pluralidad de parámetros metabólicos a "tiempo real" o "en línea".

45

50

El análisis de flujo metabólico (MFA) se basa en un marco bioquímico conocido. Se construye una matriz metabólica linealmente independiente en base a la ley de conservación de masas y a la hipótesis de estado pseudo-estacionario (PSSH) sobre los metabolitos intracelulares. Se establecen redes metabólicas, incluyendo:

55

60

65

- identificar todos los sustratos, productos y metabolitos intermediarios de la vía
- identificar todas las reacciones químicas de interconversión de los metabolitos de la vía, la estequiometría de las reacciones de la vía,
- identificar todas las enzimas que catalizan las reacciones, la cinética de reacción enzimática,
- las interacciones reguladoras entre los componentes de la vía, por ejemplo interacciones alostéricas, interacciones enzima-enzima etc.,
- compartimentalización intracelular de enzimas o cualquier otra organización supramolecular de las enzimas, y,
- la presencia de cualquier gradiente de concentración de los metabolitos, enzimas o moléculas efectoras o barreras de difusión para su movimiento.

Una vez construida la red metabólica para una cepa dada, puede introducirse la presentación matemática mediante una idea de matriz para estimar los flujos metabólicos intracelulares si están disponibles en línea los datos del metaboloma.

5 El fenotipo metabólico depende de los cambios de la red metabólica completa dentro de una célula. El fenotipo metabólico depende del cambio de utilización de la vía con respecto a las condiciones ambientales, la regulación genética, el estado de desarrollo y el genotipo, etc. Después del cálculo en línea del MFA, se analiza el comportamiento dinámico de las células, su fenotipo y otras propiedades investigando la utilización de la vía. Por ejemplo, si se aumenta el suministro de glucosa y se disminuye el oxígeno durante la fermentación con levaduras, se reducirá y/o detendrá la utilización de las vías respiratorias, y dominará la utilización de las vías de fermentación. El control del estado fisiológico de los cultivos celulares llegará a ser posible después del análisis de la vía. Los métodos descritos pueden ayudar a determinar el modo de manipular la fermentación determinando cómo cambiar el suministro de sustrato, la temperatura, el uso de inductores, etc. para controlar el estado fisiológico de las células para moverse en la dirección deseable. Los resultados del MFA también pueden combinarse con datos del transcriptoma y el proteoma para diseñar experimentos y protocolos para ingeniería metabólica o arrastre genético, etc.

Puede conferirse o detectarse cualquier fenotipo modificado o nuevo, incluyendo características nuevas o mejoradas en la célula. Puede controlarse cualquier aspecto de metabolismo o crecimiento.

20 *Control de la expresión de un transcrito de ARNm*

El fenotipo modificado por ingeniería puede comprender aumentar o disminuir la expresión de un transcrito de ARNm o generar nuevos transcritos en una célula. El transcrito de ARNm, o mensaje puede detectarse y cuantificarse mediante cualquier método conocido en la técnica incluyendo, por ejemplo, transferencias de Northern, reacciones de amplificación cuantitativa, hibridación con series, y similares. Las reacciones de amplificación cuantitativa incluyen, por ejemplo, PCR cuantitativa incluyendo, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa, o RT-PCR; RT-PCR cuantitativa a tiempo real, o "RT-PCR cinética a tiempo real" (véase, por ejemplo, Kreuzer (2001) Br. J. Haematol. 114:313-318; Xia (2001) Transplantation 72:907-914).

El fenotipo modificado por ingeniería puede generarse inactivando la expresión de un gen homólogo. Puede inactivarse la secuencia codificante del gen o uno o más elementos de control de la transcripción, por ejemplo, promotores o potenciadores. Por tanto, la expresión de un transcrito puede eliminarse completamente o solamente disminuirse.

El fenotipo modificado por ingeniería puede comprender aumentar la expresión de un gen homólogo. Esto puede realizarse inactivando un elemento de control negativo, incluyendo un elemento regulador de la transcripción que actúa en *cis* o *trans*, o mutagenizando un elemento de control positivo.

Como se analiza a continuación en detalle, puede medirse uno o más, o todos los transcritos de una célula por hibridación de una muestra que comprende transcritos de la célula, o ácidos nucleicos representativos de o complementarios a transcritos de una célula, por hibridación con ácidos nucleicos inmovilizados en una serie.

45 *Control de la expresión de polipéptidos, péptidos y aminoácidos*

El fenotipo modificado por ingeniería puede comprender aumentar o disminuir la expresión de un polipéptido o generar nuevos polipéptidos en una célula. Los polipéptidos, péptidos y aminoácidos pueden detectarse y cuantificarse mediante cualquier método conocido en la técnica incluyendo, por ejemplo, resonancia magnética nuclear (RMN), espectrofotometría, radiografía (radiomarcaje de proteínas), electroforesis, electroforesis capilar, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía por hiperdifusión, diversos métodos inmunológicos, por ejemplo inmunoprecipitación, inmunodifusión, inmuno-electroforesis, radioinmunoensayos (RIA), ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), ensayos inmuno-fluorescentes, electroforesis en gel (por ejemplo, SDS-PAGE), tinción con anticuerpos, clasificación de células activadas fluorescentes (FACS), espectrometría de masas por pirólisis, espectrometría de infrarrojos con transformada de Fourier, espectrometría Raman, GC-MS, y espectrometrías de masas LC-electronebulización y cap-LC-tándem-electronebulización, y similares. También pueden explorarse nuevas bioactividades usando métodos, o variaciones de los mismos, descritos en la patente de Estados Unidos Nº 6.057.103. Además, como se analiza a continuación en detalle, puede medirse uno o más, o todos los polipéptidos de una célula usando una serie de proteínas.

El marcaje con ¹³C fracciona dirigido de forma biosintética de aminoácidos proteinogénicos puede controlarse suministrando una mezcla de compuestos de fuente de carbono marcados uniformemente con ¹³C y no marcados en una red de biorreacción. El análisis del patrón de marcaje resultante posibilita tanto la caracterización comprensiva de la topología de la red como la determinación de las proporciones de flujo metabólico de los aminoácidos; véase, por ejemplo, Szyperski (1999) Metab. Eng. 1:189-197.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar, pero no limitar, la invención. Aunque los procedimientos descritos en los

ejemplos son típicos de aquellos que pueden usarse para realizar ciertos aspectos de la invención, también pueden usarse otros procedimientos conocidos para los especialistas en la técnica.

Ejemplos

5

Ejemplo 1: Caracterización de la actividad de fitasas ejemplares de la invención

Este ejemplo describe la caracterización de la actividad fitasa de polipéptidos de la invención, que son modificaciones de secuencia (las llamadas fitasas "evolucionadas") de la fitasa parental de la SEC ID N° 2, y un ensayo de actividad fitasa ejemplar. Este ensayo de actividad fitasa puede usarse para determinar si un polipéptido tiene suficiente actividad para estar dentro del alcance de la invención reivindicada.

10

Después de generar los polipéptidos de la invención expresando las secuencias de ácido nucleico modificadas con GSSM de la invención, los polipéptidos de fitasa "evolucionada" - solamente especies ejemplares de mutación en un único resto en este estudio - se purificaron y después se trataron con calor (pH 7,0, Tween al 0,01%) a diversas temperaturas durante 30 minutos. Después de la etapa de tratamiento con calor, las muestras (20 ul) se ensayaron con el sustrato de fluorescencia (180 ul) DiFMUP 4 mM a pH 5,5. Se compararon las tasas con las tasas de cada muestra correspondiente no tratada. Los resultados se ilustran en la Figura 1.

15

En otro estudio, las fitasas "evolucionadas" de la invención que comprenden mutaciones individuales "mezcladas", es decir fitasas que contienen múltiples mutaciones, se cultivaron durante una noche en LBCARB100™ (Lbcarb100) a 30°C. Se trataron con calor 100 ul de cada cultivo (mutante mezclado) en un termociclador desde 72°C hasta 100°C. Se mezclaron 20 ul del cultivo tratado con calor con 180 ul de DiFMUP 4 mM a pH 5,5. Las tasas se compararon con las tasas de cada muestra correspondiente no tratada; como se resume en la Figura 2. La tabla ilustrada en la Figura 3 resume gráficamente los datos (redondeados a la decena más cercana) usados para generar el gráfico de la Figura 2.

20

25

La muestra 1 a 21 corresponden a las mutaciones individuales "mezcladas" de la SEC ID N° 2 parental, como se ilustra en el diagrama de la Figura 5; obsérvese que la fitasa "evolucionada" número 10 tiene una modificación en los restos de la secuencia (a partir de la SEC ID N° 2) que no se introdujo por GSSM; esta mutación se introdujo por casualidad aleatoria y puede tener o no alguna relevancia para la estabilidad térmica de esta fitasa ejemplar de la invención. Además, obsérvese que las fitasas ejemplares marcadas con ** 19, 20 y 21 tienen etiquetas C-terminales de histidina (6xHis) (-RSHHHHHH). La Figura 5 ilustra fitasas ejemplares que tienen múltiples modificaciones de restos en la SEC ID N° 2 parental; como se describe en detalle en este documento. La Figura 6 ilustra fitasas ejemplares que tienen modificaciones en un único resto en la SEC ID N° 2 parental; como se describe en detalle en este documento.

30

35

La Figura 7 ilustra esquemáticamente un ensayo de fitasa ejemplar de la invención usando el sustrato de fluorescencia 4-metilumbeliferil fosfato (MeUMB-fosfato, cuya estructura también se ilustra): (i) la fitasa se expone a calor durante 20 minutos, 72°C, pH 4,5; y, a 80°C a pH fisiológico (pH 7,4); y (ii) se ensaya la actividad residual a 37°C, pH 4,5:

40

- Se mide la actividad residual tanto a pH alto como bajo,
- Se calcula la actividad residual con relación al tipo silvestre después del tratamiento con calor.

45

La Figura 8 ilustra esquemáticamente otro ensayo de fitasa ejemplar de la invención que también usa el sustrato de fluorescencia MeUMB-fosfato: (i) la fitasa se expone a calor durante 30 minutos, 86°C, pH 5,5; y (ii) se ensaya la actividad residual a 37°C, pH 4,5:

50

- Se mide la actividad residual con relación al control de variante 6X,
- Se seleccionan los aciertos y se vuelven a ensayar a mayor rigurosidad para seleccionar las variantes superiores.

55

Este ensayo se usó para explorar bibliotecas de variantes GSSM (de la SEC ID N° 1), ensayando la actividad fitasa de los polipéptidos que codificaban. La Figura 9 ilustra esquemáticamente el protocolo para esta exploración de biblioteca (como se describe en la Figura 8), donde el tamaño de la biblioteca explorada es de 24.576 variantes.

Ejemplo 2: Desarrollo de una fitasa con mayor termotolerancia y mayor labilidad gástrica

Este ejemplo describe el desarrollo y la caracterización de la actividad fitasa de polipéptidos de la invención, que constituyen modificaciones de la secuencia adicionales (las fitasas "evolucionadas") de la fitasa parental SEC ID N°: 2. Las fitasas evolucionadas descritas en la presente se han optimizado para su expresión en plantas y para su comercialización en grandes superficies. Las fitasas presentan una tolerancia térmica igual o mejor en comparación con la fitasa parental (SEC ID N°: 2, codificada por la SEC ID N°: 1) y una menor estabilidad gástrica *in vitro* (mayor labilidad gástrica).

65

Selección del molde:

5 El esqueleto de GSSM seleccionado presenta tanto termotolerancia como evidencias de degradación en FGS. La evaluación empezó ensayando las propiedades en FGS de trece moléculas fitasa termotolerantes (según se describe en el Ejemplo 1 anteriormente y en la Tabla 3 más adelante). Los datos de FGS para las fitasas purificadas muestran que todas las variantes termotolerantes, incluida la mutación de la fitasa parental termotolerante de un único sitio N159V (SEC ID N°: 2-N159V), fueron muy estables, mostrando una degradación mínima en dos horas.

10 La bibliografía/estudios previos sugieren que el gen *appA* de fitasa de *E. coli* (de la cepa K12 (n° de acceso de GenBank M58708)) era más susceptible a la degradación en FGS que la fitasa parental (SEC ID N°: 2). Con el fin de intentar comprender el fenómeno de estabilidad en FGS, se investigaron cinco de las variantes intermedias entre *appA* y la fitasa parental (SEC ID N°: 2) para determinar su labilidad en FGS. Los datos sugieren una fuerte correlación entre la termotolerancia y la labilidad en FGS (Figuras 11A y 11B). Cabe destacar que *appA* -7X, que difiere en un aminoácido de la fitasa parental (SEC ID N°: 2), mostró ~10% más de pérdida de actividad en FGS
15 después de una incubación de 10 minutos en comparación con la fitasa parental (SEC ID N°: 2). Estos datos nuevos implican que un cambio de una única mutación en la SEC ID N°: 2 podría conferir cambios en la tolerancia a FGS y, más importante todavía, podría diferenciarse de la fitasa parental (SEC ID N°: 2) en el ensayo de FGS. Basándose en esta nueva evidencia, se seleccionó *appA* -7X como un control de referencia para la evolución de FGS y se seleccionó la SEC ID N°: 2 como el esqueleto de GSSM para la evolución.

20 Ya que la purificación de la proteína supondría una parte integral del proceso de caracterización, se evaluó la SEC ID N°: 2 tanto como una molécula con marcador de his (SEC ID N°: 2-HIS) como una molécula sin marcador de his (SEC ID N°: 2). Se realizaron ensayos de FGS para las versiones purificadas tanto con marcador de his como sin marcador de his de la fitasa parental (SEC ID N°: 2). Los ensayos de FGS se realizaron con dos dosis diferentes de
25 pepsina (0,15 mg/mL y 0,75 mg/mL). Se determinó la actividad residual en varios puntos de evaluación (7,5, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos). No se observó ninguna diferencia significativa en los perfiles de FGS entre las dos versiones (Figura 12).

Eliminación de la N-glucosilación:

- Estudios previos sugirieron que la N-glucosilación podría mejorar la estabilidad en FGS. Por consiguiente, con el fin de reducir la estabilidad en FGS, se realizó una mutagénesis dirigida saturada (SDM) para eliminar los dos sitios de N-glucosilación en la molécula de SEC ID N°: 2 parental. El primer sitio de reconocimiento de N-glucosilación se puede eliminar ya sea cambiando la Asparagina (N) en 161 o la Treonina (T) en 163 por cualquier otro aminoácido. El segundo sitio de reconocimiento de N-glucosilación se puede eliminar cambiando la N en 339 o la T en 341 mediante el mismo proceso.
- Se realizó una SDM construyendo un cebador con el cambio de codón deseado y a continuación utilizando PCR con el cebador y el molde (secuencia parental) para crear un nuevo molde con el cambio de codón deseado. Durante la SDM, todos los otros 19 aminoácidos posibles se sustituyeron en cada uno de los cuatro residuos responsables para el reconocimiento de la N-glucosilación: sitios 161, 163, 339 y 341. Las mutaciones que mostraron las características más similares (actividad específica, termotolerancia y perfil de pH) respecto a la SEC ID N°: 2 en las cuatro posiciones se combinaron a continuación para crear una variante que no tendría ninguno de los sitios de reconocimiento de la N- glucosilación. Las cuatro mutaciones principales que conservaron las propiedades de la fitasa parental (SEC ID N°: 2) fueron N161K, T163R, N339E y T341D. Estas mutaciones se combinaron de un modo que eliminara ambos sitios de reconocimiento de la N-glucosilación en la misma molécula (Tabla 4).

Nombre	Mutaciones
Variante GLY1	N161K y N339E
Variante GLY2	N161K y T341D
Variante GLY3	T163R y N339E
Variante GLY4	T163R y T341D

Tabla 4. Variantes con eliminación de la N-glucosilación

- Se construyeron las cuatro variantes con eliminación de la glucosilación, se expresaron en *Pichia pastoris* y se caracterizaron. Se determinó la termotolerancia (semivida) de las variantes de la SEC ID N°: 2 con eliminación de la glucosilación (Variantes GLY1 - GLY4) y dos controles de SEC ID N°: 2 mediante un tratamiento térmico a 80°C durante el transcurso de 10 minutos. La SEC ID N°: 2 expresada en *Pichia* y las variantes con eliminación de la N-glucosilación (Variantes GLY1 - GLY4) tienen aproximadamente la misma termotolerancia. A pesar de ello, la SEC ID N°: 2 (expresada en *Pichia pastoris*) expresó una termotolerancia mayor que el mismo gen expresado en *E. coli* (SEC ID N°: 2-HIS). La variante principal con eliminación de la glucosilación, la Variante GLY3, tiene la misma termotolerancia, perfil de pH y actividad específica que la SEC ID N°: 2 (Figura 13). Los datos de termotolerancia fueron una sorpresa, una hipótesis de un estudio previo sugirió que la glucosilación mejoraba la termotolerancia, por consiguiente, cabía esperar que las variantes con eliminación de la glucosilación presentaran una reducción de la termotolerancia. Como era de esperar, se observó una diferencia significativa en la termotolerancia entre la SEC ID N°: 2 expresada en *E. coli* y *Pichia pastoris*. A pesar de ello, si la glucosilación no es el factor, quizás la diferencia en termotolerancia se pueda atribuir a los diferentes entornos de plegamiento de la proteína de los dos huéspedes de expresión: *Pichia*-plegamiento intracelular de la proteína, *E. coli*-plegamiento periplásmico de la proteína.

- Se incorporaron las mutaciones T163R y N339E en las principales variantes lábiles en FGS posteriormente en el proyecto (remítase a la evolución TMCASM más adelante).

- La actividad fitasa y los perfiles de pH de las variantes con eliminación de la glucosilación (Variantes GLY1 - GLY4), así como también para la SEC ID N°: 2 expresada en *Pichia* purificada, se determinaron en fitato a un pH de 2, 2,5, 3, 4, 5 y 6 a 37°C. Los datos (no se muestran) indican que las variantes con eliminación de la glucosilación tienen una actividad y un perfil de pH similares a los de la SEC ID N°: 2.

Exploración de GSSMSM en FGS de la SEC ID N°: 2

- Se seleccionó la SEC ID N°: 2-HIS como el molde para GSSM. Se realizó una evolución de GSSMSM (Gene Site Saturation MutagenesisSM, mutagénesis de saturación del sitio génico) (remítase, por ejemplo, a la Patente de EE. UU. N° 6.171.820).

Desarrollo del ensayo de alta capacidad:

- Cultivos de SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 2-6X se cultivaron en placas de microvaloración de 384 pocillos y se evaluaron en un formato de ensayo robótico automatizado para determinar su estabilidad en FGS. Las placas se trataron térmicamente a 65°C durante 30 minutos para lisar las células. A continuación, los cultivos se dividieron en una placa de control no tratada y una placa tratada con FGS. Las actividades de las muestras tratadas con FGS se compararon con las muestras de control no tratadas. Se tomaron puntos de evaluación a los 10, 20, 30 y 40 minutos

(Figura 14). El perfil de FGS de la fitasa parental (lisado celular completo) del ensayo automatizado fue el mismo que el del ensayo de FGS a escala de laboratorio purificado.

Resultados del ensayo de alta capacidad

5 Se mutó la secuencia parental entera (SEC ID N°: 2, excepto el codón de inicio), 432 codones, se expresó (en *E. coli*, según se describe más adelante) y se exploró para determinar las mejoras de la degradación en FGS utilizando el ensayo de alta capacidad para fitasas en FGS desarrollado. Se confirmaron ciento treinta y dos mutaciones
 10 novedosas para la labilidad en FGS en 69 localizaciones de residuos diferentes (Tabla 5). Al menos ocho mutaciones de sitio único cumplieron con el requisito en FGS de una degradación completa de la proteína en 10 minutos. A pesar de ello, la mayoría de estos mutantes se quedaron cortos en cuanto a las propiedades de tolerancia térmica de la fitasa parental en 4°C o más. Únicamente un mutante, Q247H, presentó una termotolerancia igual o ligeramente superior a la de la fitasa parental y una degradación completa en FGS en 10 minutos.

15 Se determinó la pérdida de actividad en FGS de mutantes seleccionados a partir de la exploración de GSSM durante el transcurso de un estudio de 20 minutos (Figura 15), en fosfato de difluoro-4-metilumbeliferilo (DiFMUP), Acetato-Na 50 mM, pH de 5,5, 0,75 mg/mL de pepsina. La caracterización de estas mutaciones de FGS mostró que la velocidad para una degradación completa se clasificó en tres categorías: rápida (menos de 2 minutos), media (~10-15 minutos) y lenta (≥ 20 minutos); los mutantes de FGS lentos mostraron tan solo una ligera mejora en
 20 comparación con la fitasa parental (SEC ID N°: 2). Los datos sugieren que el análisis de actividad es un método más sensible para determinar la descomposición de la fitasa; para una actividad residual de 20%, la banda de la fitasa no es detectable en el gel de SDS-Page (no se muestran los datos).

Los mutantes de FGS se evaluaron para determinar su termotolerancia mediante dos métodos: a) tratamiento
 25 térmico de treinta minutos a 65 °C y b) gradiente de 50-70°C de treinta minutos. Los datos de termotolerancia sugieren que la mayoría de las mutaciones de FGS perdieron ≥ 4°C con la excepción de la variante I427T y la variante Q247H. Para resolver rápidamente las deficiencias en la termotolerancia, se desarrolló una estrategia de seguimiento rápido; se incorporaron varias mutaciones de FGS muy prometedoras en más esqueletos de fitasas termotolerantes (del Ejemplo 1 anterior) para evaluar si se podía recuperar la termotolerancia (se discute en
 30 profundidad en la sección titulada Estrategia de seguimiento rápido).

Se compararon todas las mutaciones y se clasificaron las primeras 48 (Tabla 6) mediante un valor de adecuación FT (% de termotolerancia - % de FGS = FT). Las primeras mutaciones de sitio único se consideraron para su
 35 combinación en la fase de Tailored Multi-Site Combinatorial AssemblySM (TMCASM, acoplamiento combinatorio ajustado de múltiples sitios) (remítase más adelante).

Basándose en los resultados, se observaron ciertas sustituciones de aminoácidos y posiciones de residuos, cuando se cambiaron en la molécula de fitasa parental (SEC ID N°: 2), que fueron más favorables para las mejoras de labilidad en FGS que otras (Figura 16). En la Figura 16, el número debajo del símbolo del aminoácido indica cuántas
 40 veces se representa la molécula en la proteína original. Por ejemplo, la posición del residuo 48, una Treonina, se podría cambiar por nueve aminoácidos diferentes (FYWMHKVIL). Las tres adiciones de aminoácidos que incrementaron más frecuentemente la labilidad en FGS fueron Leucina (14 veces), Prolina (12 veces) e Histidina (12 veces). Como ejemplo adicional, las Argininas que estaban en la proteína original (22 veces en la SEC ID N°: 2) nunca se reemplazaron con otro aminoácido donde se observara un incremento adjunto de la labilidad en FGS. A
 45 pesar de ello, cuando se sustituyó la Arginina con otro aminoácido en la proteína original (7 veces), en cada caso, se incrementó la labilidad en FGS. Los datos de GSSM para FGS sugirieron que los puntos importantes para las mutaciones de FGS se producían en la molécula de fitasa (Figura 17). Las series más largas de mutaciones, siete en una fila, se produjeron entre los residuos 145-151. También se observaron tres conjuntos en los que se podían mutar tres residuos en una fila. Varios residuos de aminoácidos fueron promiscuos para sustituciones de
 50 aminoácidos que favorecían la labilidad en FGS, siendo el caso más extremo T48, que se reemplazó con nueve aminoácidos diferentes (F, Y, W, M, H, K, V, I y L). Para la posición 48 y 79, H fue la mejor mutación y se seleccionó como candidato para la biblioteca de TMCA.

Variante	Mutación	Variante	Mutación	Variante	Mutación	Variante	Mutación
1	P 100 A	34	Q 137 F	67	F 194 L	100	P 149 N
2	P 149 L	35	L 157 C	68	H 272 W	101	Y 79 H
3	I 427 T	36	L 150 Y	69	V 191 A	102	Q 86 H
4	T 291 W	37	V 162 T	70	S 218 Y	103	Q 275 H
5	T 291 V	38	I 174 P	71	P 217 S	104	A 274 I
6	L 126 R	39	G 353 C	72	P 217 D	105	A 274 T
7	P 254 S	40	L 150 T	73	P 217 G	106	Y 79 S

ES 2 608 690 T3

Variante	Mutación	Variante	Mutación	Variante	Mutación	Variante	Mutación
8	L 192 F	41	S 102 A	74	S 102 Y	107	H 263 P
9	Q 377 R	42	I 174 F	75	S 218 I	108	A 274 V
10	V 422 M	43	G 171 S	76	A 232 P	109	A 274 L
11	L 157 P	44	N 148 M	77	W 265 L	110	A 274 F
12	I 107 H	45	Q 137 V	78	N 266 P	111	S 389 V
13	I 108 R	46	P 145 L	79	L 167 S	112	G 395 T
14	Q 309 P	47	I 108 Y	80	L 216 T	113	G 395 Q
15	I 108 A	48	E 113 P	81	P 217 L	114	G 395 L
16	I 108 S	49	F 147 Y	82	L 244 S	115	G 395 I
17	I 107 P	50	S 173 H	83	P 269 L	116	G 395 E
18	C 155 Y	51	T 163 P	84	T 48 F	117	S 389 H
19	I 108 Q	52	N 148 R	85	T 48 W	118	I 427 G
20	A 236 T	53	S 173 V	86	T 48 M	119	I 427 S
21	S 208 P	54	A 248 L	87	T 48 H	120	A 429 P
22	A 109 V	55	A 248 T	88	T 48 K	121	P 343 E
23	G 171 M	56	Q 247 H	89	T 48 Y	122	P 343 V
24	S 173 G	57	A 236 H	90	T 48 V	123	P 343 R
25	V 162 L	58	L 269 I	91	M 51 A	124	P 343 L
26	D 139 Y	59	S 197 G	92	M 51 L	125	P 343 V
27	L 146 R	60	L 235 I	93	T 48 I	126	N 348 K
28	Q 137 Y	61	S 211 H	94	M 51 G	127	P 343 I
29	Q 137 L	62	T 282 H	95	T 48 L	128	N 348 W
30	L 146 T	63	Q 246 W	96	L 50 W	129	P 343 N
31	K 151 P	64	G 257 R	97	G 67 A	130	L 379 V
32	N 148 K	65	L 269 T	98	Y 79 W	131	Q 381 S
33	K 151 H	66	G 257 A	99	Y 79 N	132	L 379 S

Tabla 5. Nombres de las variantes y mutaciones de los resultados descubiertos a partir de la exploración de GSSM que presentan mejoras de la degradación en FGS.

- 5 Un número significativo de las variantes de GSSM cumplieron los requisitos de FGS (degradación rápida < 10% después de la supervivencia en FGS de 10 min), pero se quedan cortos en las propiedades de termotolerancia (supervivencia < 75% después de un tratamiento térmico de 30 min a 65°C). Los mutantes de degradación lenta y media cumplieron los requisitos de termotolerancia, pero no los requisitos de FGS. A partir de la exploración de GSSM, únicamente la Variante 56 (Q247H) cumplió tanto con el FGS como con las propiedades de termotolerancia.

10

Clasificación	Mutación	TT a 65C %	FGS %	Valor de adecuación	Clasificación	Mutación	TT a 65C %	FGS %	Valor de adecuación
1	Q247H	76	3	0,73	29	G257A	36	3	0,32
2	I427T	99	37	0,62	30	H263P	60	29	0,32
3	Q246W	76	23	0,53	31	Y79S	67	36	0,31
4	L157P	46	2	0,44	32	Y79N	68	38	0,30
5	Q377R	47	3	0,44	33	T48F	50	21	0,29
6	T48M	66	24	0,42	34	L296T	62	34	0,29

Clasificación	Mutación	TT a 65C %	FGS %	Valor de adecuación	Clasificación	Mutación	TT a 65C %	FGS %	Valor de adecuación
7	A274V	60	17	0,42	35	S218Y	30	2	0,28
8	A236T	47	5	0,42	36	P343R	32	6	0,26
9	Q275H	77	35	0,41	37	T48L	48	24	0,24
10	T48W	56	15	0,41	38	P149L	36	12	0,24
11	I174P	44	4	0,41	39	L167S	42	18	0,23
12	T48H	50	10	0,40	40	G67A	59	36	0,23
13	Y79H	67	27	0,40	41	P343N	47	25	0,22
14	A232P	41	1	0,40	42	P343 L	26	6	0,20
15	T48K	53	13	0,40	43	A236H	19	0	0,19
16	T48Y	63	24	0,39	44	?	36	20	0,15
17	?	45	7	0,38	45	T291W	18	3	0,14
18	P217D	40	3	0,37	46	SEC ID N°: 2	74	64	0,10
19	P217G	43	7	0,37	47	SEC ID N°: 2	70	61	0,09
20	P217S	42	5	0,37	48	S208P	11	2	0,08
21	T48I	70	34	0,36	49	L192F	22	13	0,08
22	P343V	41	5	0,36	50	SEC ID N°: 2	64	57	0,07
23	S211H	67	31	0,35	51	SEC ID N°: 2	66	59	0,07
24	T291V	36	2	0,34	52	SEC ID N°: 2	63	56	0,07
25	A274I	51	16	0,34	53	SEC ID N°: 2	67	62	0,50
26	L50W	58	26	0,33	54	Q377R	7	3	0,04
27	P343E	40	7	0,33	55	Q309P	1	2	-0,01
28	M51 L	60	28	0,33		SEC ID N°: 2 MEDIA	67	60	0,07

Tabla 6. Clasificación de los principales mutantes de FGS. Los 132 mutantes se compararon conjuntamente para determinar los mejores mutantes de la exploración de FGS. Los primeros 49 mutantes de FGS se clasificaron y se compararon con seis controles independientes (fitasa parental - SEC ID N°: 2). Las variantes se clasificaron según sus propiedades de termotolerancia (% de supervivencia en TT a 65°C %) y labilidad en FGS (supervivencia en FGS – FGS %). Se estableció un valor de adecuación arbitrario (FV) = (TT a 65°C %) - (FGS %) y las variantes con el FV más elevado, marcadas en naranja, se consideraron para una evolución adicional utilizando la tecnología TMCA.

- 5
- 10 Dos de las tres primeras mutaciones (Q246W and Q247H) presentaron unas propiedades de termotolerancia similares a las de la fitasa parental (SEC ID N°: 2) y unas mejoras significativas de la labilidad en FGS. Utilizando una modelización tridimensional, se observó que se predice que W246 quede enterrada debajo de la superficie de la proteína, lo cual hace necesario que la proteína se adapte a una cadena lateral de triptófano más grande en lo que ya era un entorno densamente empaquetado alrededor de una cadena lateral de glutamina. Además, la proteína se debe adaptar a la pérdida de un puente de hidrógeno entre el oxígeno épsilon de la cadena lateral de Q246 y el nitrógeno de la cadena principal de G255, ya que no hay oxígeno en la cadena lateral en los residuos de triptófano.
- 15 El análisis estructural también indicó que, aunque la cadena principal de H247 quedaría enterrada, la cadena lateral de imidazol conseguiría salir a la superficie. Aunque el cambio de glutamina a histidina es un cambio relativamente conservativo, esto crea un nuevo grupo accesible en la superficie en esta región que está disponible para la protonación a un pH más bajo, lo cual claramente alteraría la red local de puentes de hidrógeno, actuando potencialmente como un interruptor ácido para modificar la estructura de la proteína local en esta región, dejando que la proteína sea más susceptible a la degradación por parte de la pepsina y de ácidos.
- 20

Estrategia de seguimiento rápido

- 25 Para resolver las propiedades de termotolerancia que se perdieron en las variantes principales lábiles en FGS (excepto Q247H), se inició una estrategia de seguimiento rápido para diseñar moléculas de fitasa que tuvieran

ambas propiedades deseadas: FGS y termotolerancia. Las fitasas termotolerantes (SEC ID N°: 2-N159V, SEC ID N°: 2-6X y SEC ID N°: 2-9X) del trabajo de evolución previo (remítase al Ejemplo 1 anterior) se seleccionaron como esqueletos para las dos rondas de mutagénesis dirigida al sitio (SDM).

- 5 La primera SDM incorporó cada una de las mutaciones de FGS únicas (T291V, A236T o L157P) en cada uno de los tres esqueletos termotolerantes, según se muestra en la tabla a continuación (Tabla 7).

Ronda I de SDM				
Variante	Progenitor (esqueleto)	Marcador de His	Huésped – 10 mejores	Mutaciones adicionales
A	SEC ID N°: 2-6X	X	X	T291 V
B	SEC ID N°: 2-6X	X	X	A236T
C	SEC ID N°: 2-6X	X	X	L157P
D	SEC ID N°: 2-N159V	X	X	L157P
E	SEC ID N°: 2-N159V	X	X	A236T
F	SEC ID N°: 2-N159V	X	X	T291 V
G	SEC ID N°: 2-9X	X	X	L157P
H	SEC ID N°: 2-9X	X	X	A236T
I	SEC ID N°: 2-9X	X	X	T291 V

Tabla 7. Variantes de la ronda I de SDM

- 10 Los datos de esta primera ronda de SDM sugirieron que se produjeron mejoras en la labilidad en FGS en las variantes obtenidas a partir del esqueleto de SEC ID N°: 2-N159V. A pesar de ello, las mutaciones de FGS también redujeron las propiedades de termotolerancia por debajo del objetivo. Las variantes de los otros dos esqueletos termotolerantes (SEC ID N°: 2-6X y SEC ID N°: 2-9X) mostraron únicamente unas mejoras mínimas de la degradación en FGS. También se observó que la adición de más mutaciones de FGS en el esqueleto de SEC ID N°: 15 2-N159V redujo la termotolerancia por debajo del objetivo de termotolerancia.

- Se realizó una segunda ronda de SDM que añadió más mutaciones de FGS a las dos otras variantes termotolerantes mediante la incorporación de hasta dos mutaciones de FGS (T291V y/o L192F) en SEC ID N°: 2-6X 20 y SEC ID N°: 2-9X, ambas con o sin la mutación A236T (remítase a la Tabla 8 a continuación).

Ronda II de SDM				
Variante	Progenitor (esqueleto)	Marcador de His	Huésped – 10 mejores	Mutaciones adicionales
J	SEQ ID NO:2-6X	X	X	L192F
K	SEQ ID NO:2-6X	X	X	T291 V
L	SEQ ID NO:2-6X	X	X	T291 V + L192F
M	SEQ ID NO:2-9X	X	X	L192F
N	SEQ ID NO:2-9X	X	X	T291 V
O	SEQ ID NO:2-9X	X	X	T291 V + L192F
P	SEQ ID NO:2-6X + (A236T)	X	X	L192F
Q	SEQ ID NO:2-6X + (A236T)	X	X	T291 V
R	SEQ ID NO:2-6X + (A236T)	X	X	T291 V + L192F
S	SEQ ID NO:2-9X + (A236T)	X	X	L192F
T	SEQ ID NO:2-9X + (A236T)	X	X	T291 V
U	SEQ ID NO:2-9X + (A236T)	X	X	T291 V + L192F

Tabla 8. Variantes de la ronda II de SDM

El resultado de esta SDM produjo una variante, la Variante O, con una tolerancia térmica ligeramente mejor que la de la fitasa parental (SEC ID N^o: 2) y una degradación completa en menos de 10 min en FGS. Por ejemplo, en los puntos de evaluación T-0 y T-10 (min) utilizando diferentes dosis de pepsina en FGS (0,3, 0,2, 0,1, 0,05, 0,025 y 0 mg/mL de pepsina), los geles de SDS-PAGE teñidos con Simply Blue™ SafeStain mostraron que la Variante O se degradaba totalmente en 10 minutos con 0,3 mg/mL y 0,2 mg/mL de pepsina. El transcurso de veinte minutos en FGS (con 0,3 mg/mL de pepsina), de nuevo con análisis en geles de SDS-PAGE, mostró que SEC ID N^o: 2-HIS no se degrada después de 20 minutos, mientras que la Variante O se degrada totalmente en alrededor de 7,5 minutos.

Se determinó la estabilidad en FGS de la Variante O y la SEC ID N^o: 2-HIS para diferentes dosis de pepsina: 0,3, 0,2, 0,1, 0,05, 0,025 y 0,0 mg/mL de Pepsina (Figura 18). En la Figura 18, la dosis de 0,3 mg/mL de pepsina para la SEQ ID NO:2-HIS se representa gráficamente como referencia. Los experimentos de respuesta a la dosis indicaron que la pepsina es necesaria para obtener una degradación completa y que no es tan solo una función del tratamiento ácido (Figura 18).

Se determinó la semivida de la Variante O y la SEC ID N^o: 2-HIS a 75°C (Figura 19). La fitasa parental purificada (SEC ID N^o: 2-HIS) y la variante de fitasa Variante O, en dos tampones diferentes (Citrato 100 mM de pH 5,5 y Tris 100 mM de pH 7,2), se trataron térmicamente a 75°C durante un máximo de 45 minutos (T-0, 5, 10, 15, 20, 30, 45 min). Se analizaron diez microlitros de las muestras tratadas térmicamente para determinar su actividad en 100 µL de DiFMUP 100 µM, Citrato 50 mM de pH 5,5. La actividad se comparó con la actividad a T-0. La Variante O cumplió con los requisitos de termotolerancia y FGS, a pesar de ello, la actividad específica fue inferior a la deseada (Figura 19). Cabía esperar una pérdida de actividad específica debido a conocimientos previos del trabajo de evolución anterior (Ejemplo 1), que indicó que el esqueleto de SEC ID N^o: 2-6X tenía tan solo 2/3 de la actividad específica de la fitasa parental (SEC ID N^o: 2).

Para maximizar la estrategia de TMCA y resolver las deficiencias de la Variante O, el planteamiento era mezclar mutaciones termotolerantes que conservaran la actividad específica con mutaciones de FGS utilizando la fitasa parental (SEC ID N^o: 2-HIS) como molde.

Evolución de TMCASM

El ensayo de alta capacidad se modificó para incluir un paso de tratamiento térmico con el fin de seleccionar variantes que tuvieran las propiedades termotolerantes, así como también de FGS, deseadas. Se crearon dos bibliotecas utilizando la tecnología de Tailored Multi-Site Combinatorial Assembly (TMCA), acoplamiento combinatorio ajustado de múltiples sitios (remítase a la Publicación de PCT N^o WO 09/018449). La evolución de TMCA comprende un método para producir una pluralidad de polinucleótidos de la progenie con diferentes combinaciones de varias mutaciones en múltiples sitios. El método se puede llevar a cabo, en parte, mediante una combinación de al menos uno o más de los siguientes pasos:

Obtener información sobre la secuencia de un polinucleótido (“el primero” o “el molde”). Por ejemplo, la primera secuencia o secuencia molde puede ser una secuencia de origen natural (por ejemplo, SEC ID N^o: 2-N159V) o mutada (por ejemplo, el “molde D164R”, que se describe más adelante). La información sobre la secuencia puede ser del polinucleótido completo (por ejemplo, un gen o un marco abierto de lectura) o de regiones parciales de interés, tal como una secuencia que codifica un sitio para la unión, especificidad de unión, catálisis o especificidad de sustrato.

Identificar tres o más mutaciones de interés a lo largo de la primera secuencia de polinucleótido o la secuencia molde de polinucleótido. Por ejemplo, las mutaciones pueden estar en 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 20 o más posiciones en la primera secuencia o secuencia molde. Las posiciones se pueden predeterminar mediante la posición absoluta o mediante el contexto de homología o residuos adyacentes. Para el TMCA de los polipéptidos fitasa, se incluyeron, como mutaciones de interés, los principales cambios de aminoácidos termotolerantes y de FGS que dieron como resultado un rendimiento enzimático mejorado. Se pueden conocer las secuencias que flanquean las posiciones de las mutaciones en cada lado. Cada posición de mutación puede contener dos o más mutaciones, por ejemplo, para diferentes aminoácidos. Tales mutaciones se pueden identificar utilizando la tecnología de Gene Site Saturation MutagenesisSM (GSSMSM, mutagénesis de saturación del sitio génico), según se describe en la presente y en las Patentes de EE. UU. N^{os} 6.171.820, 6.562.594 y 6.764.835.

Proporcionar cebadores (por ejemplo, oligonucleótidos sintéticos) que comprenden las mutaciones de interés. En una realización, se proporciona un cebador para cada mutación de interés. De este modo, un primer polinucleótido o polinucleótido molde que tenga 3 mutaciones de interés puede utilizar 3 cebadores en esa posición. El cebador también se puede proporcionar como una agrupación de cebadores que contenga una posición degenerada, de modo que la mutación de interés sea la gama de cualquier nucleótido o aminoácido de origen natural, o un subconjunto de esa gama. Por ejemplo, se puede proporcionar una agrupación de cebadores que favorezca las mutaciones de residuos de aminoácidos alifáticos.

Los cebadores se pueden preparar como cebadores directos o inversos, o los cebadores se pueden preparar como al menos un cebador directo y al menos un cebador inverso. Cuando las mutaciones se sitúan cerca las unas de las

otras, puede resultar conveniente utilizar cebadores que contengan mutaciones para más de una posición o diferentes combinaciones de mutaciones en múltiples posiciones.

5 **Proporcionar un polinucleótido que contiene la secuencia molde.** El primer polinucleótido o polinucleótido molde puede ser circular, o puede estar superenrollado, tal como un plásmido o vector para clonación, secuenciación o expresión. El polinucleótido puede ser monocatenario ("ADNmc") o puede ser bicatenario ("ADNbc"). Por ejemplo, el método de TCMA somete el molde de ADNbc superenrollado ("se") a un paso de calentamiento a 95°C durante 1 min (remítase a Levy, *Nucleic Acid Res.*, 28(12):e57(i-vii) (2000)).

10 **Añadir los cebadores al polinucleótido molde en una mezcla de reacción.** Los cebadores y el polinucleótido molde se combinan en condiciones que permitan que los cebadores se hibriden con el polinucleótido molde. En una realización del protocolo de TMCA, los cebadores se añaden al polinucleótido en una mezcla de reacción única, pero se pueden añadir en múltiples reacciones.

15 **Ejecución de reacciones de extensión de la polimerasa.** Los productos de extensión (por ejemplo, como una "progenie" o un "polinucleótido extendido modificado") se pueden amplificar utilizando métodos convencionales. Los productos se pueden analizar para determinar su longitud, secuencia, propiedades deseadas del ácido nucleico, o se pueden expresar como polipéptidos. Otros métodos de análisis incluyen la hibridación *in situ*, la exploración de la secuencia o exploración de la expresión. El análisis puede incluir una o más rondas de exploración y la selección de
20 una propiedad deseada.

Los productos también se pueden transformar en una célula u otro sistema de expresión, tal como un sistema exento de células. El sistema exento de células puede contener enzimas relacionadas con la replicación del ADN, su
25 reparación, recombinación, transcripción o traducción. Los huéspedes ilustrativos incluyen células y líneas celulares bacterianas, de levadura, vegetales y animales, e incluyen *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pichia pastoris* y *Aspergillus niger*. Por ejemplo, las cepas XL1-Blue o Stb12 de *E. coli* se pueden utilizar como huéspedes.

El método de la invención se puede utilizar con los mismos cebadores o cebadores diferentes en condiciones de
30 reacción diferentes para propiciar productos que tengan diferentes combinaciones o números de mutaciones.

Al llevar a cabo el método ilustrativo descrito anteriormente, este protocolo también proporciona uno o más polinucleótidos producidos mediante este método de evolución de TMCA, los cuales se pueden explorar o
35 seleccionar a continuación en función de una propiedad deseada. Uno o más de los polinucleótidos de la progenie se pueden expresar como polipéptidos y opcionalmente explorar o seleccionar en función de una propiedad deseada. De este modo, esta realización del protocolo de evolución de TMCA proporciona polinucleótidos y los polipéptidos codificados, así como también bibliotecas de tales polinucleótidos que codifican tales polipéptidos. Esta realización del protocolo de evolución de TMCA proporciona además la exploración de las bibliotecas mediante la exploración o selección de la biblioteca para obtener uno o más polinucleótidos que codifiquen uno o más polipéptidos que tengan la actividad deseada.

40 Otra realización del protocolo de evolución de TMCA descrito en la Publicación de PCT N° WO 2009/018449 comprende un método para producir una pluralidad de polinucleótidos modificados. Tales métodos incluyen generalmente (a) añadir al menos tres cebadores a un polinucleótido molde bicatenario en una mezcla de reacción única, donde dichos al menos tres cebadores no se solapan y donde cada uno de dichos al menos tres cebadores
45 comprende al menos una mutación diferente de los demás cebadores, donde al menos un cebador es un cebador directo que se puede hibridar con una hebra menos del molde y al menos un cebador es un cebador inverso que se puede hibridar con una hebra más del molde, y (b) someter la mezcla de reacción a una reacción de extensión de la polimerasa para obtener una pluralidad de polinucleótidos modificados extendidos a partir de dichos al menos tres cebadores.

50 Otra realización del protocolo de evolución de TMCA descrito en la Publicación de PCT N° WO 2009/018449 comprende un método donde una célula se transforma con la pluralidad de productos extendidos que no se han tratado con una ligasa. En otra realización de la invención, la pluralidad de polinucleótidos modificados extendidos se recupera a partir de la célula. En otra realización, la pluralidad recuperada de polinucleótidos modificados extendidos
55 se analiza, por ejemplo, expresando al menos uno de la pluralidad de polinucleótidos modificados extendidos y analizando el polipéptido expresado a partir de este. En otra realización, se selecciona la pluralidad de polinucleótidos modificados extendidos que comprende las mutaciones de interés.

60 En otra realización del protocolo de evolución de TMCA, se obtiene información de la secuencia referente al polinucleótido molde, y se pueden identificar tres o más mutaciones de interés a lo largo del polinucleótido molde. En otra realización, se pueden analizar los productos obtenidos mediante la extensión de la polimerasa antes de transformar la pluralidad de productos modificados extendidos en una célula.

65 En una realización del protocolo de evolución de TMCA, los productos obtenidos mediante la extensión de la polimerasa se tratan con una enzima, por ejemplo, una enzima de restricción, tal como una enzima de restricción *DpnI*, con lo que se destruye la secuencia del polinucleótido molde. Los productos tratados se pueden transformar

en una célula, por ejemplo, una célula de *E.coli*.

En una realización del protocolo de evolución de TMCA, se pueden utilizar al menos dos, o al menos tres, o al menos cuatro, o al menos cinco, o al menos seis, o al menos siete, o al menos ocho, o al menos nueve, o al menos diez, o al menos once, o al menos doce o más cebadores. En una realización, cada cebador comprende una mutación de un único punto. En otra realización, dos cebadores directos o dos cebadores inversos comprenden un cambio diferente en la misma posición del polinucleótido molde. En otra realización, al menos un cebador comprende al menos dos cambios en posiciones diferentes del polinucleótido molde. En otra realización más, al menos un cebador comprende al menos dos cambios en posiciones diferentes y al menos dos cebadores directos o dos cebadores inversos comprenden un cambio diferente en la misma posición del polinucleótido molde.

En una realización del protocolo de evolución de TMCA, los cebadores directos se agrupan en un grupo directo y los cebadores inversos se agrupan en un grupo inverso, y los cebadores en el grupo directo y los cebadores en el grupo inverso, independientemente los unos de los otros, se normalizan para que tengan la misma concentración en el grupo correspondiente, independientemente de las posiciones en el polinucleótido molde, y donde después de la normalización se añade una cantidad equivalente de los cebadores directo e inverso a la reacción. En este método de normalización, se puede dar preferencia a una combinación de algunas posiciones. La preferencia puede ser debida, por ejemplo, a una concentración del cebador relativamente baja en una posición que contiene un único cebador en comparación con una posición que contiene múltiples cebadores. La expresión "preferencia posicional" se refiere a los polinucleótidos resultantes que muestran una fuerte preferencia por la incorporación de cebadores en una única posición en comparación con las demás posiciones dentro de su grupo de cebadores directos o inversos. Esto da como resultado una combinación de polinucleótidos modificados que pueden presentar un porcentaje elevado de mutaciones en una única posición del cebador, pero un porcentaje bajo de mutaciones en otra posición dentro de su grupo de cebadores directos o inversos. Esta preferencia es desfavorable cuando el objetivo del TMCA consiste en generar polinucleótidos de la progenie que comprendan todas las combinaciones posibles de cambios en el molde. La preferencia se puede corregir, por ejemplo, normalizando los cebadores como una agrupación en cada posición para que sean equivalentes.

En una realización del protocolo de evolución de TMCA, la primera normalización se lleva a cabo organizando los cebadores en múltiples grupos dependiendo de su localización en el polinucleótido molde, donde los cebadores que cubren la misma región seleccionada del molde se encuentran en un grupo; normalizando los cebadores agrupados en cada grupo para que tengan una concentración equivalente; agrupando los cebadores directos dentro de un grupo en un grupo directo y normalizando la concentración entre cada grupo de los cebadores directos para que sea equivalente; agrupando los cebadores inversos dentro de un grupo en un grupo inverso y normalizando la concentración entre cada grupo de los cebadores inversos para que sea equivalente; y añadiendo una cantidad equivalente de los cebadores directos e inversos agrupados a la reacción. No se ha observado ninguna preferencia por combinaciones de posiciones.

En una realización del protocolo de evolución de TMCA, se proporciona un conjunto de cebadores degenerados, comprendiendo cada uno una posición degenerada, donde la mutación de interés es una gama de diferentes nucleótidos en la posición degenerada. En otra realización, se proporciona un conjunto de cebadores degenerados que comprenden al menos un codón degenerado correspondiente a al menos un codón del polinucleótido molde y al menos una secuencia adyacente que es homóloga a la secuencia adyacente al codón de la secuencia del polinucleótido molde. En otra realización, el codón degenerado es N,N,N y codifica cualquiera de los 20 aminoácidos de origen natural. En otra realización, el codón degenerado codifica menos de los 20 aminoácidos de origen natural.

Otra realización del protocolo de evolución de TMCA descrito en la Publicación de PCT N° WO 2009/018449 comprende un método para producir una pluralidad de polinucleótidos modificados que comprenden las mutaciones de interés. Tales métodos incluyen generalmente (a) añadir al menos dos cebadores a un polinucleótido molde bicatenario en una mezcla de reacción única, donde dichos al menos dos cebadores no se solapan y donde cada uno de dichos al menos dos cebadores comprende al menos una mutación diferente del otro cebador o de los demás cebadores, donde al menos un cebador es un cebador directo que se puede hibridar con una hebra menos del molde y al menos un cebador es un cebador inverso que se puede hibridar con una hebra más del molde, y (b) someter la mezcla de reacción a una reacción de extensión de la polimerasa para obtener una pluralidad de polinucleótidos modificados extendidos a partir de dichos al menos dos cebadores, (c) tratar la pluralidad de polinucleótidos modificados extendidos con una enzima, con lo que se destruye el polinucleótido molde, (d) transformar los polinucleótidos modificados extendidos tratados que no se hayan tratado con una ligasa en una célula, (e) recuperar la pluralidad de polinucleótidos modificados extendidos a partir de la célula y (f) seleccionar la pluralidad de polinucleótidos modificados extendidos que comprenden las mutaciones de interés.

Utilizando la tecnología de TMCA, se creó una pequeña biblioteca, la Biblioteca A, para dar un giro rápido y para simplificar el proceso (96 variantes diferentes que contenían hasta cinco mutaciones de FGS y dos mutaciones de termotolerancia, remítase a la Tabla 9). La Biblioteca A utilizó un único molde, la SEC ID N°: 2-N159V, y los oligos enumerados en la Tabla 10 más adelante. También se creó una segunda biblioteca más exhaustiva, la Biblioteca B, utilizando la tecnología de TMCA con el fin de incrementar el potencial para crear una variante muy termotolerante con las propiedades de FGS requeridas (4096 variantes diferentes que contenían hasta siete mutaciones de FGS y

cinco mutaciones de termotolerancia, remítase a la Tabla 9). La Biblioteca B utilizó dos moldes, la SEC ID N°: 2-N159V y el “molde D164R”, en dos reacciones de TMCA independientes, utilizando cada una los oligos enumerados en la Tabla 11, para crear dos subbibliotecas. El “molde D164R” se generó en la Biblioteca A y consistió en el esqueleto de la SEC ID N°: 2-N159V con la mutación D164R incorporada. Ambas bibliotecas se amplificaron en el vector pQE60 (Qiagen, Valencia, CA) y a continuación se transformaron en el huésped PHY635 (que se describe más adelante) para confirmar la actividad de fitasa primaria y secundaria.

Se descubrió un total de ocho resultados prometedores lábiles en FGS termotolerantes mediante la exploración de las bibliotecas. Se descubrieron cinco variantes lábiles en FGS termotolerantes (T_m ~ 5°C superior a la de la fitasa parental, SEC ID N°: 2, Tabla 13) en la biblioteca pequeña (Variantes AA-EE, Tabla 12). La biblioteca de TMCA más grande produjo 10 candidatos, a pesar de ello, solo tres presentaron una termotolerancia mayor que las variantes AA - EE (las Variantes FF-HH, Tabla 13, presentaron una T_m ~ 7.5°C superior a la de la fitasa parental, SEC ID N°: 2). Para la exploración de caracterización, estas variantes, junto con la mejor mutación de FGS de sitio único (Variante 56), todas como versiones glucosiladas y con eliminación de la glucosilación, se expresaron en *Pichia pastoris* (las versiones con eliminación de la glucosilación incluían las dos mutaciones, T163R y N339E, de la investigación de eliminación de la N- glucosilación, remítase más arriba).

Se determinó la actividad residual de las variantes de fitasa lábiles en FGS durante el tratamiento en FGS (Figura 20). La fitasa parental purificada (SEC ID N°: 2), la Variante 56 y la Variante AA-HH se trataron con FGS (pH de 1,2) con pepsina (10U / µg de fitasa) durante el transcurso de 10,0 minutos. La actividad de la fitasa se determinó mediante la actividad en DiFMUP. La actividad específica de las variantes de fitasa lábiles en FGS fue comparable a la de la fitasa de SEC ID N°: 2 (Figura 21). La fitasa parental purificada (SEC ID N°: 2) y las variantes de fitasa principales se evaluaron para determinar su actividad en fitato. La proteína purificada se evaluó en fitato 4 mM, Acetato-Na 100 mM, pH de 4,5 a 37°C. No se observó ningún cambio significativo en las propiedades de termotolerancia ni FGS entre las principales variantes glucosiladas y no glucosiladas expresadas en *Pichia* (Figuras 20 y 21). Trabajos previos predijeron que las variantes glucosiladas presentarían una termotolerancia mayor y serían más tolerantes a FGS; nuestros datos sugieren lo contrario.

Además, se generó un perfil de pH de las variantes glucosiladas y con eliminación de la glucosilación, y de la fitasa parental (SEC ID N°: 2) para la actividad fitasa en fitato a un pH de 2, 2,5, 3, 4, 5 y 6 a 37°C. Todas las fitasas evaluadas presentaron unos perfiles de pH muy similares (no se muestran los datos).

Biblioteca A		Biblioteca B	
Mutaciones de FGS	Mutaciones termotolerantes	Mutaciones de FGS	Mutaciones termotolerantes
Q247H	Q275V	Q247H	G179R
I427T	D164R	I427T	Q275V
L157P		L157P	T349Y
Q275H		Q275H	C226D
T48M		T48M	D164R
		Q246W	
		Q377R	
		Y79H	

Tabla 9. Mutaciones seleccionadas para la evolución de TMCA. Se mezclaron mutaciones de termotolerancia y mutaciones de FGS utilizando la tecnología de TMCA, empleando la SEC ID N°: 2-N159V como esqueleto.

Nombre del oligo	Secuencia del oligo - 5' - 3'	
T48M_F	TGCGTGCTCCAACCAAGGCCATGCAACTGATGCAGGATGTCA C	SEC ID N°: 3
L157P_F	TAAAAACTGGCGTTTGCCAACCGGATGTGGCGAACGTGACTG ACGCGATCCTCGAGAGGGCAGGA	SEC ID N°: 4
D164R_F		SEC ID N°: 5

ES 2 608 690 T3

Nombre del oligo	Secuencia del oligo - 5' - 3'	
	TAAAACTGGCGTTTGGCAACTGGATGTGGCGAACGTGACTC GTGCGATCCTCGAGAGGGCAGGA	
L157P-D164_R	TAAAACTGGCGTTTGGCAACCGGATGTGGCGAACGTGACTC GTGCGATCCTCGAGAGGGCAGGA	SEC ID N°: 6
Q247H_R	GAGATATTTCTCCTGCAACATGCACAGGGAATGCCGGAGCC	SEC ID N°: 7
Q275H_R	TGCTAAGTTTGCATAACGCGCATTGTTGATTTGCTACAACGCAC	SEC ID N°: 8
Q275V_R	TGCTAAGTTTGCATAACGCGGTGTTGATTTGCTACAACGCAC	SEC ID N°: 9
I427T_R	AATCGTGAATGAAGCACGCACACCGGCGTGCAGTTTGAGAT	SEC ID N°: 10

Tabla 10. Oligos utilizados en la Biblioteca A

Nombre del oligo	Secuencia del oligo - 5' - 3'	
T48M_F	TGCGTGCTCCAACCAAGGCCATGCAACTGATGCAGGA TGTCAC	SEC ID N°: 11
Y79H_F	GCGGTGGTGAAGCTAATCGCCCATCTCGGACATTACTG GCGTCA	SEC ID N°: 12
L157P_F	TAAAACTGGCGTTTGGCAACCGGATGTGGCGAACGT GACTGA	SEC ID N°: 13
G179R_F	GGTCAATTGCTGACTTTACCCGCCATTATCAAACGGCG TTTCG	SEC ID N°: 14
C226D_F	AACTCAAGGTGAGCGCCGACGATGTCTCATTAAACGG TGCGGT	SEC ID N°: 15
Q246W_R	TGACGGAGATATTTCTCCTGTGGCAAGCACAGGGAAT GCCGGA	SEC ID N°: 16
Q246W+Q247H_R	TGACGGAGATATTTCTCCTGTGGCATGCACAGGGAAT GCCGGAGCC	SEC ID N°: 17
Q247H_R	CGGAGATATTTCTCCTGCAACATGCACAGGGAATGCC GGAGCC	SEC ID N°: 18
Q275V_R	TGCTAAGTTTGCATAACGCGGTGTTGATTTGCTACAA CGCAC	SEC ID N°: 19
T349Y_R	TTCCCGGTCAGCCGGATAACTATCCGCCAGGTGGTGA ACTGGT	SEC ID N°: 20

Nombre del oligo	Secuencia del oligo - 5' - 3'	
Q377R_R	TTCAGGTTTCGCTGGTCTTCCGCACTTTACAGCAGATG CGTGA	SEC ID N°: 21
I427T_R	AATCGTGAATGAAGCACGCACACCGGCGTGCAAGTTTG AGAT	SEC ID N°: 22

Tabla 11. Oligos utilizados en la Biblioteca B

Tipo de mutación ---->	FGS	FGS	FGS	Termo	Glucos	Termo	Termo	Termo	FGS	FGS	Termo	FGS	Glucos	Termo	FGS	FGS
Variante	T48M	Y79H	L157P	N159V	T163R	D164R	G179R	C226D	Q246W	Q247H	Q275V	Q275H	N339E	T349Y	Q377R	I427T
AA				X	X	X				X		X	X			
BB	X			X	X					X	X		X			
CC	X			X	X	X				X	X		X			X
DD	X			X	X	X				X			X			
EE	X			X	X					X	X		X			
FF	X	X		X	X	X				X	X		X	X		
GG	X	X		X	X	X	X	X		X	X		X			
HH	X			X	X	X	X	X	X	X	X		X			
56					X					X			X			

5 Tabla 12. Secuencia de las principales variantes de fitasa termotolerantes lábiles en FGS

La Variante AA es la SEC ID N°: 28 (codificada por la SEC ID N°: 27), la Variante BB es la SEC ID N°: 32 (codificada por la SEC ID N°: 31), la Variante CC es la SEC ID N°: 34 (codificada por la SEC ID N°: 33), la Variante DD es la SEC ID N°: 36 (codificada por la SEC ID N°: 35), la Variante EE es la SEC ID N°: 38 (codificada por la SEC ID N°: 37), la Variante FF es la SEC ID N°: 24 (codificada por la SEC ID N°: 23), la Variante GG es la SEC ID N°: 26 (codificada por la SEC ID N°: 25), la Variante HH es la SEC ID N°: 40 (codificada por la SEC ID N°: 39) y la Variante 56 es la SEC ID N°: 30 (codificada por la SEC ID N°: 29). Sin embargo, cabe destacar que las SEC ID N°s: 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37 y 39 no incluyen los ácidos nucleicos que codifican la secuencia señal nativa y que las SEC ID N°s: 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 y 40 sí que incluyen los aminoácidos de la secuencia señal nativa (aminoácidos 1-22 de la SEC ID N°: 2). Se añade una Metionina de inicio (ATG) en cada una de las secuencias a las que se ha hecho referencia. Las posiciones de las mutaciones puntuales para estas variantes (enumeradas, por ejemplo, en la Tabla 12) se cuentan como si la secuencia señal nativa estuviera presente.

Tm según DSC	Biblioteca	Glucosilada (Tm en Celsius)	Con eliminación de la glucosilación (Tm en Celsius)
SEC ID N°: 2		79,8	N/A
Variante AA (SEC ID N°: 28)	A	85,2	85,8
Variante BB (SEC ID N°: 32)	A	84,2	85,8
Variante CC (SEC ID N°: 34)	A	85,6	85,2
Variante DD (SEC ID N°: 36)	A	83,8	84,2
Variante EE (SEC ID N°: 38)	A	85,4	84,6
Variante FF (SEC ID N°: 24)	B	87,5	87,6
Variante GG (SEC ID N°: 26)	B	87,3	87,0
Variante HH (SEC ID N°: 40)	B	87,4	86,2

Tm según DSC	Biblioteca	Glucosilada (Tm en Celsius)	Con eliminación de la glucosilación (Tm en Celsius)
Variante 56 (SEC ID N°: 30)		81,0	81,3

Tabla 13. Temperatura de fusión (Tm) de la SEC ID N°: 2 y de los principales candidatos de FGS. La fitasa parental purificada (SEC ID N°: 2) y los nueve candidatos principales de fitasa de FGS se expresaron en *Pichia pastoris*, se purificaron, se sometieron a diálisis en Citrato 100 mM de pH 5,5 y se evaluaron para determinar su Tm utilizando la termodinámica aplicada N-DSCII.

Selección de las mejores cuatro variantes para estudios con animales

Tras el análisis de SDS-PAGE en FGS en nueve puntos de evaluación (0, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0 y 10 minutos), con una dosis de pepsina de 10U por µg de fitasa, se seleccionaron cuatro variantes basándose en estos datos de caracterización (no se muestran) para llevar a cabo una fermentación a gran escala que se utilizaría en ensayos con animales. Los cuatro candidatos seleccionados mostraron una degradación proteica completa en cinco minutos.

Candidatos seleccionados:

La **Variante 56** (SEC ID N°: 30, codificada por la SEC ID N°: 29) es la variante más parecida a la molécula de fitasa parental original (SEC ID N°: 2), con una mutación de FGS y dos mutaciones de eliminación de la glucosilación.

La **Variante AA** (SEC ID N°: 28, codificada por la SEC ID N°: 27) tiene dos mutaciones de FGS, dos mutaciones termotolerantes y dos mutaciones de eliminación de la glucosilación.

La **Variante FF** (SEC ID N°: 24, codificada por la SEC ID N°: 23) tiene tres mutaciones de FGS, cuatro mutaciones termotolerantes y dos mutaciones de eliminación de la glucosilación.

La **Variante GG** (SEC ID N°: 26, codificada por la SEC ID N°: 25) tiene tres mutaciones de FGS, cinco mutaciones termotolerantes y dos mutaciones de eliminación de la glucosilación.

Fermentación de los candidatos principales:

Los candidatos principales (Variante 56, Variante AA, Variante FF y Variante GG) se seleccionaron para realizar ensayos con animales y se escalaron para fermentaciones de 30L con el fin de producir al menos 5 g de cada proteína. Basándose en la actividad y el análisis proteico de Bradford, se produjo una cantidad ≥ 16 g de proteína para cada variante. Las muestras recuperadas se liofilizaron, a continuación se volvieron a suspender y se trataron térmicamente para eliminar el posible crecimiento microbiano y a continuación se volvieron a liofilizar. Estas muestras (Tabla 14) se utilizaron para ensayos con animales. Junto con las cuatro variantes seleccionadas, se utilizó una pequeña muestra (15-50 mg) de las demás variantes lábiles en FGS (Tabla 12) para la evaluación a escala de laboratorio.

Variante	Sólido (g)	Proteína (g)	Unidades de actividad
56 (SEC ID N°: 30)	106,2	8,34	$1,37 \times 10^7$
AA (SEC ID N°: 28)	98,9	10,9	$1,72 \times 10^7$
FF (SEC ID N°: 24)	132,0	14,2	$2,16 \times 10^7$
GG (SEC ID N°: 26)	109,6	17,4	$3,09 \times 10^7$
Variante		Proteína (mg)	
BB (SEC ID N°: 32)		30	
DD (SEC ID N°: 36)		50	
CC (SEC ID N°: 34)		20	
EE (SEC ID N°: 38)		40	
HH (SEC ID N°: 40)		15	
SEC ID N°: 2		30	

Tabla 14. Especificaciones de las muestras utilizadas para ensayos con animales y para la evaluación a escala de laboratorio. El producto liofilizado se cuantificó mediante tanto un ensayo de actividad como un ensayo proteico de Bradford.

Métodos

Crecimiento, inducción y purificación

Expresión de las fitasas en *E. coli* (escala de 2L)

5 Todas las variantes de fitasa, excepto las de los estudios de glucosilación, se expresaron en *E. coli*; cepa PHY635 (cepa phy; creada sometiendo la cepa de *E. coli* CU1867 (ATCC 47092; deficiente en *appA*) a Rec A- hasta transducción de fagos P1). Los cultivos de partida de las variantes de fitasa se cultivaron en 5 mL de LBcarb100 a 37C durante ~ 18 h. Se inocularon 2L de LBcarb100 con los cultivos de partida durante toda la noche, se indujo el cultivo con IPTG 1 mM cuando el cultivo alcanzó una $DO_{600} \sim 0,5$. Después de 24 h de inducción, los cultivos se recolectaron formando pellets del cultivo mediante centrifugación (centrífuga Sorvall RC 5C Plus; rotor SLC-4000, 7000 RPM; 9220 RCF) durante 20 minutos. Las células se volvieron a suspender en Tris 50 mM a un pH de 8,0 y se lisaron utilizando un microfluidizador (Microfluidics modelo 110L). Para eliminar los residuos celulares, se centrifugó el lisado celular completo (Sorvall RC 5C Plus; rotor F13S-14X50, 12500 RPM; 25642 RCF) durante 30 minutos. El lisado transparente se filtró de forma estéril y la proteína fitasa se purificó a través de una columna HisTrap FF de 5 mL en un instrumento AKTA FPLC. La fitasa se eluyó con un gradiente de imidazol 2 M, Tris 50 mM de pH 8,0. Las fracciones se evaluaron para determinar su actividad en DiFMUP 100 μ M, Acetato-Na 100 mM (pH 5,5) y se sometieron a un análisis en gel de SDS para determinar la pureza de la proteína.

20 Expresión de las fitasas en *Pichia Pastoris* (escala de 1L)

La caracterización de las principales variantes de fitasa finales (versiones con adición de glucosilación y con eliminación de glucosilación de las Variantes AA - HH y la Variante 56), junto con las versiones con eliminación de glucosilación de la SEC ID N°: 2 (Variantes GLY1 - GLY4) se expresaron en *Pichia pastoris* (X-33). Los cultivos de partida de las variantes de fitasa se cultivaron en 10 mL de BMGYzeo100 a 30°C durante ~ 18 h ($DO_{600} \sim 15-20$), se formaron pellets de las células y se volvieron a suspender en 10 mL de medio MES* con 0,5% de MeOH. Se inoculó 1L de medio MES* con 0,5% de MeOH con el cultivo de partida y se incubó durante tres-cuatro días a 30°C (se añadieron 5mL de MeOH cada 24 h para la inducción de la proteína). La proteína secretada se separó de la masa celular mediante centrifugación (centrífuga Sorvall RC 5C Plus; rotor SLC-4000, 7000 RPM; 9220 RCF), se concentró y se cambió de tampón (Acetato-Na 100 mM, pH de 5,5) utilizando el módulo de separación de flujo tangencial MiniKros (SpectrumLabs M215-600-01P). Para mejorar la pureza, la muestra se hizo pasar a través de una columna HiTrap™ Q FF de 5 mL en un instrumento AKTA FPLC. La fitasa se eluyó con un gradiente de NaCl 1 M, Acetato-Na 100 mM de pH 5,5. Las fracciones se evaluaron para determinar su actividad en DiFMUP 100 μ M, Acetato-Na 100 mM (pH 5,5) y se sometieron a un análisis en gel de SDS para determinar la pureza de la proteína.

35 Caracterización de las fitasas

Termotolerancia de las proteínas

40 *Calorimetría diferencial de barrido (DSC)*- Se determinó la temperatura de fusión de la proteína (T_m) para las variantes de fitasa expresadas en *Pichia* utilizando la termodinámica aplicada N-DSC II. Las muestras proteicas (~1.0 mg/mL) se sometieron a diálisis en Citrato 100 mM de pH 5,5, se introdujeron en una cámara de prueba (600 μ L) y se compararon con la muestra de control (600 μ L de Citrato 100 mM de pH 5,5) y se sometieron a un barrido desde 60 hasta 100°C y de vuelta a 60°C (para evaluar el repliegamiento de la proteína).

45 *Determinación de la T_m modificada*- Herramienta de termotolerancia rápida desarrollada para evaluar muestras de proteínas no purificadas y de lisados celulares completos durante la caracterización preliminar para comparar la termotolerancia de fitasas lábiles en FGS con la fitasa parental (SEC ID N°: 2). La muestra de la proteína se distribuyó a lo largo de una fila en una placa de PCR de 96 pocillos (20 μ L por pocillo) y se trató térmicamente a lo largo de un gradiente (60-80°C) en la máquina de PCR durante 30 minutos. Las muestras proteicas tratadas térmicamente (10 μ L) se mezclaron con un sustrato de fluorescencia (190 μ L de DiFMUP 100 μ M, Acetato-Na 50 de pH 5,5) y se midió el cambio de fluorescencia (EX360nm/EM465nm) durante el transcurso de cinco minutos. La temperatura en la que se conserva un 50% de la actividad se comparó con el comportamiento de la fitasa parental (SEC ID N°: 2) (temperatura para un 50% de actividad).

55 Ensayo en FGS (modificado-reducción de escala)

Se establecieron múltiples minirreacciones, desactivadas en diferentes puntos de evaluación, para determinar la labilidad en FGS de la molécula de fitasa. Como referencia T-0 de control, también se analizó una reacción en FGS predesactivada similar al experimento real. Se incubaron 10 μ L de la muestra de proteína en 50 μ L de FGS de pH 1,2 (2 mg/mL de NaCl, 7 μ L/mL de HCl concentrado) con pepsina (dosis de 0,15, 0,30 y 0,75 mg/mL) durante un cierto tiempo a 37°C. La reacción se desactivó añadiendo 10 μ L de tampón de Carbonato-Na 200 mM de pH 10,0 (este paso se llevó a cabo antes de añadir la muestra de proteína para la referencia T-0).

65 *Análisis de FGS en gel de SDS*- Se retiraron 20 μ L de la reacción en FGS desactivada y se mezclaron con 210 μ L de tampón de muestra de SDS, se hirvieron durante 10 minutos y se introdujeron 15 μ L en un gel de SDS-Page de

Tris-Gly. Se aplicaron 180V, 250 mA, a través del tampón de análisis de muestras de SDS durante ~ 1 hora o hasta la finalización.

5 *Análisis de actividad en FGS*- Se retiraron 10 uL de la reacción en FGS desactivada y se mezclaron con sustrato (190 uL de DiFMUP 100 uM, Acetato-Na 50 mM de pH 5,5), se midió el cambio de fluorescencia (EX360nm/EM465nm) durante el transcurso de cinco minutos.

10 **Ensayo en FGS (adaptado a partir de la Farmacopea de los Estados Unidos 24, Fluido gástrico simulado 2000, TS, en el Formulario Nacional 19; Consejo directivo, Eds.; Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos, Inc., Rockville, MD, pág. 2235)**

15 Se incubaron 50 uL de fitasa de concentración 5 mg/mL en 950 uL precalentados a 37°C de FGS (2 mg/mL de NaCl, titulado hasta un pH de 1,2 con HCl) con 10 U de pepsina/ ug de proteína de prueba (760 ug/mL de FGS) durante el transcurso de 10 minutos a 37°C. Los puntos de evaluación se tomaron retirando 50 uL de reacción y mezclándolos con 50 uL de solución de terminación (Carbonato-Na 200 mM, pH de 10,0). Los puntos de evaluación (muestras finalizadas) se mantuvieron en hielo hasta que se completó el ensayo y estuvieron listos para el análisis (de acuerdo con el análisis de FGS en gel de SDS y el análisis de actividad en FGS, expuestos en el apartado de Ensayo en FGS (modificado-reducción de escala)).

20 **Análisis de la actividad específica de las fitasas**

25 Las muestras de fitasa (50 uL) se evaluaron para determinar su actividad relativa en 950 uL precalentados a 37°C de fitato 4,0 mM, ácido acético 100 mM, titulados hasta un pH de 4,5 con NaOH. La reacción se desactivó retirando 50 uL de reacción y mezclándolos con 50 uL de solución de detención/color (molibdato de amonio 20 mM/ vanadato de amonio 5 mM/solución de ácido nítrico al 10%). Después de un desarrollo del color de 10 minutos, se midieron los puntos de evaluación a 415 nm y los resultados se representaron en una gráfica en función del tiempo. La velocidad de reacción se comparó con el patrón de fosfato para determinar la velocidad relativa.

30 La actividad específica se determinó calculando la velocidad relativa en función de la concentración de la proteína. La concentración de la proteína se determinó mediante un análisis a 260nm/280nm (DO₂₈₀ 1A corresponde a 0,93 mg/mL). Se llevó a cabo una comparación secundaria añadiendo actividades fitasa equivalentes a gel de SDS y cuantificando las intensidades de las bandas proteicas utilizando un análisis de densitometría en gel GelPro para comparar la correlación de la actividad de los candidatos principales de fitasa y la fitasa parental (SEC ID N°: 2).

35 **Análisis del perfil de pH de las fitasas**

40 El mismo que el protocolo anterior de actividad específica, excepto que el sustrato se modificó con una capacidad de tampón más amplia (pH de 2-6). Sustrato: fitato 4 mM, ácido málico 80 mM, ácido fórmico 80 mM y Acetato-Na 80 mM titulado hasta un pH diferente (2, 2,5, 3, 4, 5 y 6 unidades de pH). Las velocidades relativas para cada variante se compararon con la actividad óptima, que se obtuvo para un pH de 4.

Materiales:

45 Ensayo en FGS

Pepsina procedente de mucosa de estómago porcino (Sigma P-6887)
HCl (Fisher UN1789)
Cloruro de sodio (Fisher S-271-1)
Fosfato de 6,8-difluoro-4-metilumbeliferilo (DiFMUP) (Invitrogen- D22068)
50 Geles de SDS PAGE con 4-20% de Tris-Glicina (Invitrogen EC60255BOX)
Tampón para muestras de SDS de Tris-Glicina Novex (InvitrogenNovex LC2676)
Tampón para análisis de SDS Novex (Invitrogen LC2675)
Simply Blue™ SafeStain (Invitrogen LC6065)

55 Análisis de la actividad específica de las fitasas

60 Fitato de dodecasodio de arroz (Sigma P-3168)
Metavanadato de amonio (Acros Organics 194910500)
Molibdato de amonio (Sigma A-7302)
Fosfato de potasio, dibásico (Fisher P288-500)
Ácido nítrico al 70% (Sigma 380091)
Solución de amonio al 25% (Atlas Chemical AA-3060)

65 Purificación de las proteínas

Columna de Ni-Sepharose HisTrap™ FF de 5 mL (GE Healthcare 17-5255-01)

Columna de intercambio aniónico HiTrap™ Q FF de 5 mL (GE Healthcare 17-5156-01)
Imidazol (Sigma I-0125)

- 5 Se han descrito una serie de realizaciones, que se proporcionan en la presente. A pesar de ello, se sobreentenderá que se pueden realizar varias modificaciones sin alejarse del alcance que se proporciona en la presente. Por consiguiente, otras realizaciones se encuentran dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Verenium Corporation

WEINER, David

5 SOLBAK, Arne

MCCANN, Ryan

<120> FITASAS, ÁCIDOS NUCLEICOS QUE LAS CODIFICAN Y MÉTODOS PARA SU PRODUCCIÓN Y USO

<130> D1370-17WO

10 <140> Todavía sin asignar

< 141> 2010-05-20

<150> 61/180,283

< 151> 2009-05-21

<160> 40

15 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

< 211> 1299

< 212> ADN

< 213> Secuencia artificial

20 <220>

< 223> Generado sintéticamente

<400> 1

ES 2 608 690 T3

atgaaagcga tcttaatccc atttttatct cttctgattc cgtaacccc gcaatctgca 60
 ttcgctcaga gtgagccgga gctgaagctg gaaagtgtgg tgattgtcag tgcgtcatggt 120
 gtgctgctc caaccaaggc cacgcaactg atgcaggatg tcaccccaga cgcattggcca 180
 acctggccgg taaaactggg tgagctgaca ccgcgcggtg gtgagctaata cgcctatctc 240
 ggacattact ggctgcagcg tctggtagcc gacggattgc tgcctaaatg tggctgcccg 300
 cagtctggtc aggtcgcgat tattgctgat gtcgacgagc gtaccgtaa aacaggcgaa 360
 gccttcgccc cgggctggc acctgactgt gcaataaccg tacataacca ggagatagc 420
 tccagctccc atccgttatt taatcctcta aaaactggcg ttgccaact ggataacgcg 480
 aacgtgactg acgcatcct cgagagggca ggagggtaa ttgctgactt taccgggcat 540
 tatcaaaggc cgtttcgcga actggaacgg gtgcttaatt ttccgcaatc aaacttgtgc 600
 cttaaactg agaaacagga cgaaagctgt tcattaacgc aggcattacc atcggaaactc 660
 aaggtgagcg ccgactgtgt ctcatcacc ggtgcggtaa gcctcgcac aatgctgacg 720
 gagatatttc tcctgcaaca agcacagga atgccggagc cggggtgggg aaggatcacc 780
 gattcacacc agtggaaacac cttgctaagt ttgcataacg cgcaatttga tttgctacaa 840
 cgcacgccag aggttgccc cagccgccc accccgttat tagatttgat caagacagcg 900
 ttgacgccc atccaccgca aaaacaggcg tatggtgtga cattaccac ttcagtgtg 960
 tttatcggc gacacgatac taatctggca aatctcggcg gcgcaactgga gctcaactgg 1020
 acgcttccc gtcagccgga taacacgcc ccaggtggtg aactggtgtt tgaacgctgg 1080
 cgtcggctaa gcgataacag ccagtgatt caggtttcgc tggcttcca gactttacag 1140
 cagatgcgtg ataaaacgcc gctgtcatta aatacggcg ccggagaggt gaaactgacc 1200
 ctggcaggat gtgaagagcg aaatgcgag ggcattggtt cgttggcag ttttacgcaa 1260
 atcgtgaatg aagcacgcat accggcgtgc agtttgtaa 1299

5 <210> 2
 < 211> 432
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

<220>
 < 223> Generado sintéticamente

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

<400> 2

ES 2 608 690 T3

Met Lys Ala Ile Leu Ile Pro Phe Leu Ser Leu Leu Ile Pro Leu Thr
 1 5 10 15

Pro Gln Ser Ala Phe Ala Gln Ser Glu Pro Glu Leu Lys Leu Glu Ser
 20 25 30

Val Val Ile Val Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Ala Thr
 35 40 45

Gln Leu Met Gln Asp Val Thr Pro Asp Ala Trp Pro Thr Trp Pro Val
 50 55 60

Lys Leu Gly Glu Leu Thr Pro Arg Gly Gly Glu Leu Ile Ala Tyr Leu
 65 70 75 80

Gly His Tyr Trp Arg Gln Arg Leu Val Ala Asp Gly Leu Leu Pro Lys
 85 90 95

Cys Gly Cys Pro Gln Ser Gly Gln Val Ala Ile Ile Ala Asp Val Asp
 100 105 110

Glu Arg Thr Arg Lys Thr Gly Glu Ala Phe Ala Ala Gly Leu Ala Pro
 115 120 125

Asp Cys Ala Ile Thr Val His Thr Gln Ala Asp Thr Ser Ser Pro Asp
 130 135 140

Pro Leu Phe Asn Pro Leu Lys Thr Gly Val Cys Gln Leu Asp Asn Ala
 145 150 155 160

ES 2 608 690 T3

Asn Val Thr Asp Ala Ile Leu Glu Arg Ala Gly Gly Ser Ile Ala Asp
 165 170 175

Phe Thr Gly His Tyr Gln Thr Ala Phe Arg Glu Leu Glu Arg Val Leu
 180 185 190

Asn Phe Pro Gln Ser Asn Leu Cys Leu Lys Arg Glu Lys Gln Asp Glu
 195 200 205

Ser Cys Ser Leu Thr Gln Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Val Ser Ala
 210 215 220

Asp Cys Val Ser Leu Thr Gly Ala Val Ser Leu Ala Ser Met Leu Thr
 225 230 235 240

Glu Ile Phe Leu Leu Gln Gln Ala Gln Gly Met Pro Glu Pro Gly Trp
 245 250 255

Gly Arg Ile Thr Asp Ser His Gln Trp Asn Thr Leu Leu Ser Leu His
 260 265 270

Asn Ala Gln Phe Asp Leu Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser
 275 280 285

Arg Ala Thr Pro Leu Leu Asp Leu Ile Lys Thr Ala Leu Thr Pro His
 290 295 300

Pro Pro Gln Lys Gln Ala Tyr Gly Val Thr Leu Pro Thr Ser Val Leu
 305 310 315 320

Phe Ile Ala Gly His Asp Thr Asn Leu Ala Asn Leu Gly Gly Ala Leu
 325 330 335

Glu Leu Asn Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly
 340 345 350

Gly Glu Leu Val Phe Glu Arg Trp Arg Arg Leu Ser Asp Asn Ser Gln
 355 360 365

Trp Ile Gln Val Ser Leu Val Phe Gln Thr Leu Gln Gln Met Arg Asp
 370 375 380

Lys Thr Pro Leu Ser Leu Asn Thr Pro Pro Gly Glu Val Lys Leu Thr
 385 390 395 400

Leu Ala Gly Cys Glu Glu Arg Asn Ala Gln Gly Met Cys Ser Leu Ala
 405 410 415

Gly Phe Thr Gln Ile Val Asn Glu Ala Arg Ile Pro Ala Cys Ser Leu
 420 425 430

<210> 3
 < 211> 43
 < 212> ADN

< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Secuencia de oligonucleótido

<400> 3
5 tgcgtgctcc aaccaaggcc atgcaactga tgcaggatgt cac 43

<210> 4
< 211> 65
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

10 <220>
< 223> Secuencia de oligonucleótido

<400> 4
taaaaactgg cgtttgccaa ccggatgtgg cgaacgtgac tgacgcgatc ctcgagaggg 60
cagga 65

<210> 5
15 < 211> 65
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Secuencia de oligonucleótido

20 <400> 5
taaaaactgg cgtttgccaa ctggatgtgg cgaacgtgac tcgtgcgatc ctcgagaggg 60
cagga 65

<210> 6
< 211> 65
< 212> ADN
25 < 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Secuencia de oligonucleótido

<400> 6
taaaaactgg cgtttgccaa ccggatgtgg cgaacgtgac tcgtgcgatc ctcgagaggg 60
cagga 65

30 <210> 7
< 211> 41
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Secuencia de oligonucleótido

<400> 7
gagatatttc tctgcaaca tgcacagga atgccggagc c 41

5 <210> 8
< 211> 43
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

10 <220>
< 223> Secuencia de oligonucleótido

<400> 8
tgctaagttt gcataacgcg cattttgatt tgctacaacg cac 43

15 <210> 9
< 211> 43
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Secuencia de oligonucleótido

20 <400> 9
tgctaagttt gcataacgcg gtgtttgatt tgctacaacg cac 43

<210> 10
< 211> 41
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

25 <220>
< 223> Secuencia de oligonucleótido

<400> 10
aatcgtgaat gaagcacgca caccggcgtg cagtttgaga t 41

30 <210> 11
< 211> 43
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Secuencia de oligonucleótido

35 <400> 11
tgcgtgctcc aaccaaggcc atgcaactga tgcaggatgt cac 43

<210> 12
< 211> 43
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

5 <220>
< 223> Secuencia de oligonucleótido

<400> 12
gcggtggtga gctaatcgcc catctcggac attactggcg tca 43

10 <210> 13
< 211> 43
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Secuencia de oligonucleótido

15 <400> 13
taaaaactgg cgtttgccaa ccggatgtgg cgaacgtgac tga 43

<210> 14
< 211> 43
< 212> ADN
20 < 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Secuencia de oligonucleótido

<400> 14
ggtcaattgc tgactttacc cgccattatc aaacggcggt tcg 43

25 <210> 15
< 211> 43
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

<220>
30 < 223> Secuencia de oligonucleótido

<400> 15
aactcaaggt gagcgccgac gatgtctcat taaccggtgc ggt 43

<210> 16
< 211> 43
< 212> ADN
35 < 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Secuencia de oligonucleótido

<400> 16
tgacggagat atttctctg tggcaagcac agggaatgcc gga 43

5 <210> 17
< 211> 46
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

10 <220>
< 223> Secuencia de oligonucleótido

<400> 17
tgacggagat atttctctg tggcatgcac agggaatgcc ggagcc 46

15 <210> 18
< 211> 43
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Secuencia de oligonucleótido

20 <400> 18
cggagatatt tctctgcaa catgcacagg gaatgccgga gcc 43

<210> 19
< 211> 43
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

25 <220>
< 223> Secuencia de oligonucleótido

<400> 19
tgctaagttt gcataacgcg gtgttgatt tgctacaacg cac 43

30 <210> 20
< 211> 43
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Secuencia de oligonucleótido

35 <400> 20
ttcccgtca gccggataac tatccgccag gtggtgaact ggt 43

<210> 21
< 211> 43
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

5 <220>
< 223> Secuencia de oligonucleótido

<400> 21
ttcaggttc gctggtcttc cgcaacttac agcagatgcg tga 43

10 <210> 22
< 211> 41
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Secuencia de oligonucleótido

15 <400> 22
aatcgtgaat gaagcagca caccggcgtg cagtttgaga t 41

20 <210> 23
< 211> 1236
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Generado sintéticamente

<400> 23

ES 2 608 690 T3

atgcagagtg agccggagct gaagctggaa agtgtggtga ttgtcagtcg tcatggtgtg 60
 cgtgctccaa ccaaggccat gcaactgatg caggatgtca cccagacgc atggccaacc 120
 tggccggtaa aactgggtga gctgacaccg cgcggtggtg agctaatacgc ccatctcgga 180
 cactactggc gtcagcgtct ggtagccgac ggattgctgc ctaaagtgg ctgcccgcag 240
 tctggtcagg tcgcgattat tgctgatgtc gacgagcgtc cccgtaaac aggcgaagcc 300
 ttcgccgccg ggtgtgcacc tgactgtgca ataaccgtac ataccaggc agatacgtcc 360
 agtcccgatc cgttatatta tctctaaaa actggcgttt gccaaactgga tgtggcgaac 420
 gtgagacgtg cgatcctcga gagggcagga gggcaattg ctgactttac cgggcattat 480
 caaacggcgt ttcgcgaact ggaacgggtg cttaattttc cgcaatcaaa cttgtgcctt 540
 aaacgtgaga aacaggacga aagctgttca ttaacgcagg cattaccatc ggaactcaag 600
 gtgagcgcog actgtgtctc attaaccggt gcgtaagcc tcgcatcaat gctgacggag 660
 atatttctcc tgcaacatgc acagggaatg ccggagccgg ggtggggaag gatcaccgat 720
 tcacaccagt ggaacacctt gctaagtttg cataacgcgg tgtttgattt gctacaacgc 780
 acgccagagg ttgccgcag ccgcgccacc ccgttattag atttgatcaa gacagcgttg 840
 acgccccatc caccgcaaaa acaggcgtat ggtgtgacat taccacttc agtgctgttt 900
 atcgccggac acgatactaa tctggcaaat ctcgcgccgc cactggagct cgaatggacg 960
 cttcccggtc agccggataa ctatccgcca ggtgtggaac tgggtgttga acgctggcgt 1020
 cggctaagcg ataacagcca gtggattcag gtttcgctgg tcttcagac tttacagcag 1080
 atgcgtgata aaacgccgct gtcattaaat acgcccccg gagaggtgaa actgaccctg 1140
 gcaggatgtg aagagcgaaa tgccgagggc atgtgttcgt tggcaggttt tacgcaaatc 1200
 gtgaatgaag cacgcatacc ggcgtgcagt ttgtaa 1236

<210> 24

< 211> 411

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

5

<220>

< 223> Generado sintéticamente

<400> 24

ES 2 608 690 T3

Met Gln Ser Glu Pro Glu Leu Lys Leu Glu Ser Val Val Ile Val Ser
1 5 10 15

Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Ala Met Gln Leu Met Gln Asp
20 25 30

Val Thr Pro Asp Ala Trp Pro Thr Trp Pro Val Lys Leu Gly Glu Leu
35 40 45

Thr Pro Arg Gly Gly Glu Leu Ile Ala His Leu Gly His Tyr Trp Arg
50 55 60

Gln Arg Leu Val Ala Asp Gly Leu Leu Pro Lys Cys Gly Cys Pro Gln
65 70 75 80

Ser Gly Gln Val Ala Ile Ile Ala Asp Val Asp Glu Arg Thr Arg Lys
85 90 95

Thr Gly Glu Ala Phe Ala Ala Gly Leu Ala Pro Asp Cys Ala Ile Thr
100 105 110

Val His Thr Gln Ala Asp Thr Ser Ser Pro Asp Pro Leu Phe Asn Pro
115 120 125

Leu Lys Thr Gly Val Cys Gln Leu Asp Val Ala Asn Val Arg Arg Ala
130 135 140

Ile Leu Glu Arg Ala Gly Gly Ser Ile Ala Asp Phe Thr Gly His Tyr
145 150 155 160

Gln Thr Ala Phe Arg Glu Leu Glu Arg Val Leu Asn Phe Pro Gln Ser
165 170 175

Asn Leu Cys Leu Lys Arg Glu Lys Gln Asp Glu Ser Cys Ser Leu Thr
180 185 190

Gln Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Val Ser Ala Asp Cys Val Ser Leu
195 200 205

Thr Gly Ala Val Ser Leu Ala Ser Met Leu Thr Glu Ile Phe Leu Leu
210 215 220

Gln His Ala Gln Gly Met Pro Glu Pro Gly Trp Gly Arg Ile Thr Asp
225 230 235 240

Ser His Gln Trp Asn Thr Leu Leu Ser Leu His Asn Ala Val Phe Asp
245 250 255

ES 2 608 690 T3

Leu Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser Arg Ala Thr Pro Leu
 260 265 270

Leu Asp Leu Ile Lys Thr Ala Leu Thr Pro His Pro Pro Gln Lys Gln
 275 280 285

Ala Tyr Gly Val Thr Leu Pro Thr Ser Val Leu Phe Ile Ala Gly His
 290 295 300

Asp Thr Asn Leu Ala Asn Leu Gly Gly Ala Leu Glu Leu Glu Trp Thr
 305 310 315 320

Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Tyr Pro Pro Gly Gly Glu Leu Val Phe
 325 330 335

Glu Arg Trp Arg Arg Leu Ser Asp Asn Ser Gln Trp Ile Gln Val Ser
 340 345 350

Leu Val Phe Gln Thr Leu Gln Gln Met Arg Asp Lys Thr Pro Leu Ser
 355 360 365

Leu Asn Thr Pro Pro Gly Glu Val Lys Leu Thr Leu Ala Gly Cys Glu
 370 375 380

Glu Arg Asn Ala Gln Gly Met Cys Ser Leu Ala Gly Phe Thr Gln Ile
 385 390 395 400

Val Asn Glu Ala Arg Ile Pro Ala Cys Ser Leu
 405 410

<210> 25

< 211> 1236

< 212> ADN

5 < 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Generado sintéticamente

<400> 25

atgcagagtg agccggagct gaagctggaa agtgtggtga ttgtcagtcg tcatggtgtg	60
cgtgctccaa ccaaggccat gcaactgatg caggatgtca cccagacgc atggccaacc	120
tggccggtaa aactgggtga gctgacaccg cgcggtggtg agctaatcgc ccatctcgga	180
cattactggc gtcagcgtct ggtagccgac ggattgctgc ctaaagtgg ctgcccgcag	240
tctggtcagg tcgcgattat tgctgatgtc gacgagcgta cccgtaaac aggccaagcc	300
ttcgccgcog ggctggcacc tgactgtgca ataaccgtac ataccagc agatacgtcc	360
agtcccgate cgttatattaa tctctaaaa actggcgttt gcccaactgga tgtggcgaac	420

10

ES 2 608 690 T3

gtgagacgtg cgatcctcga gagggcagga ggggtcaattg ctgactttac cggccattat 480
 caaacggcgt ttcgcgaact ggaacgggtg cttaattttc cgcaatcaaa cttgtgcctt 540
 aaacgtgaga aacaggacga aagctgttca ttaacgcagg cattaccatc ggaactcaag 600
 gtgagcgccg acgatgtctc attaaccggt gcggtgaagcc tcgcatcaat gctgacggag 660
 atatttctcc tgcaacatgc acagggaatg ccggagccgg ggtggggaag gatcaccgat 720
 tcacaccagt ggaacacctt gctaagtttg cataacgcgg tgtttgattt gctacaacgc 780
 acgccagagg ttgccgcgag ccggccacc ccgttattag atttgatcaa gacagcgttg 840
 acgccccatc caccgcaaaa acagggctat ggtgtgacat taccacttc agtgtgttt 900
 atcgccggac acgatactaa tctggcaaat ctcggcggcg cactggagct cgaatggacg 960
 cttcccggtc agccggataa cacgcccca ggtggtgaac tgggtttga acgctggcgt 1020
 cggctaagcg ataacagcca gtggattcag gtttcgctgg tcttccagac tttacagcag 1080
 atgctgata aaacgccgct gtcattaat acgccgccg gagagtgaa actgaccctg 1140
 gcaggatgtg aagagcgaaa tgcgcagggc atgtgttcgt tggcaggtt tacgcaaatc 1200
 gtgaatgaag cacgcatacc ggcgtgcagt ttgtaa 1236

<210> 26
 < 211> 411
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

5

<220>
 < 223> Generado sintéticamente

<400> 26
 Met Gln Ser Glu Pro Glu Leu Lys Leu Glu Ser Val Val Ile Val Ser
 1 5 10 15
 Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Ala Met Gln Leu Met Gln Asp
 20 25 30
 Val Thr Pro Asp Ala Trp Pro Thr Trp Pro Val Lys Leu Gly Glu Leu
 35 40 45
 Thr Pro Arg Gly Gly Glu Leu Ile Ala His Leu Gly His Tyr Trp Arg
 50 55 60
 Gln Arg Leu Val Ala Asp Gly Leu Leu Pro Lys Cys Gly Cys Pro Gln
 65 70 75 80
 Ser Gly Gln Val Ala Ile Ile Ala Asp Val Asp Glu Arg Thr Arg Lys
 85 90 95

10

ES 2 608 690 T3

Thr Gly Glu Ala Phe Ala Ala Gly Leu Ala Pro Asp Cys Ala Ile Thr
 100 105 110
 Val His Thr Gln Ala Asp Thr Ser Ser Pro Asp Pro Leu Phe Asn Pro
 115 120 125
 Leu Lys Thr Gly Val Cys Gln Leu Asp Val Ala Asn Val Arg Arg Ala
 130 135 140
 Ile Leu Glu Arg Ala Gly Gly Ser Ile Ala Asp Phe Thr Arg His Tyr
 145 150 155 160
 Gln Thr Ala Phe Arg Glu Leu Glu Arg Val Leu Asn Phe Pro Gln Ser
 165 170 175
 Asn Leu Cys Leu Lys Arg Glu Lys Gln Asp Glu Ser Cys Ser Leu Thr
 180 185 190
 Gln Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Val Ser Ala Asp Asp Val Ser Leu
 195 200 205
 Thr Gly Ala Val Ser Leu Ala Ser Met Leu Thr Glu Ile Phe Leu Leu
 210 215 220
 Gln His Ala Gln Gly Met Pro Glu Pro Gly Trp Gly Arg Ile Thr Asp
 225 230 235 240
 Ser His Gln Trp Asn Thr Leu Leu Ser Leu His Asn Ala Val Phe Asp
 245 250 255
 Leu Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser Arg Ala Thr Pro Leu
 260 265 270
 Leu Asp Leu Ile Lys Thr Ala Leu Thr Pro His Pro Pro Gln Lys Gln
 275 280 285
 Ala Tyr Gly Val Thr Leu Pro Thr Ser Val Leu Phe Ile Ala Gly His
 290 295 300
 Asp Thr Asn Leu Ala Asn Leu Gly Gly Ala Leu Glu Leu Glu Trp Thr
 305 310 315 320
 Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Glu Leu Val Phe
 325 330 335
 Glu Arg Trp Arg Arg Leu Ser Asp Asn Ser Gln Trp Ile Gln Val Ser
 340 345 350

ES 2 608 690 T3

Leu Val Phe Gln Thr Leu Gln Gln Met Arg Asp Lys Thr Pro Leu Ser
 355 360 365

Leu Asn Thr Pro Pro Gly Glu Val Lys Leu Thr Leu Ala Gly Cys Glu
 370 375 380

Glu Arg Asn Ala Gln Gly Met Cys Ser Leu Ala Gly Phe Thr Gln Ile
 385 390 395 400

Val Asn Glu Ala Arg Ile Pro Ala Cys Ser Leu
 405 410

- <210> 27
- < 211> 1236
- < 212> ADN
- < 213> Secuencia artificial

5

- <220>
- < 223> Generado sintéticamente

<400> 27
 atgcagagtg agccggagct gaagctggaa agtgtggtga ttgtcagtcg tcatggtgtg 60
 cgtgctccaa ccaagggcac gcaactgatg caggatgtca cccagacgc atggccaacc 120
 tggccggtaa aactgggtga gctgacaccg cgcggtggtg agctaatcgc ctatctcggg 180
 cactactggc gtcagcgtct ggtagccgac ggattgctgc ctaaagtgtg ctgcccgcag 240
 tctgttcagg tcgcgattat tgctgatgtc gacgagcgtc cccgtaaac aggcgaagcc 300
 ttcgccgccg ggctggcacc tgactgtgca ataaccgtac ataccaggc agatacgtcc 360
 agtcccgatc cgttatatta tctctaaaa actggcgttt gccaaactgga tgtggcgaac 420
 gtgagacgtg cgatcctcga gagggcagga gggcaattg ctgactttac cgggcattat 480
 caaacggcgt ttcgcgaact ggaacgggtg cttaattttc cgcaatcaaa cttgtgcctt 540
 aaacgtgaga aacaggacga aagctgttca ttaacgcagg cattaccatc ggaactcaag 600
 gtgagcgcgc actgtgtctc attaaccggt gcgtaagcc tcgcatcaat gctgacggag 660
 atatttctcc tgcaacatgc acagggaatg ccggagccgg ggtggggaag gatcaccgat 720
 tcacaccagt ggaacacctt gctaagtttg cataacgcgc attttgattt gctacaacgc 780
 acgccagagg ttgccgcag ccgcgccacc ccgttattag atttgatcaa gacagcgttg 840
 acgccccatc caccgcaaaa acagggcgtat ggtgtgacat taccacttc agtgctgttt 900
 atcgccggac acgatactaa tctggcaaat ctcgccggcg cactggagct cgaatggacg 960
 cttcccggtc agccggataa cagcccgcca ggtggtgaac tgggtgttga acgctggcgt 1020
 cggctaagcg ataacagcca gtggattcag gtttcgctgg tcttcagac ttacagcag 1080
 atgcgtgata aaacgcgcgt gtcattaat acgccgcccg gagagtgaa actgaccctg 1140
 gcaggatgtg aagagcgaaa tgccagggc atgtgttcgt tggcaggttt tacgcaaatc 1200
 gtgaatgaag cacgcatacc ggcgtgcagt ttgtaa 1236

10

ES 2 608 690 T3

<210> 28
 < 211> 411
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

5

<220>
 < 223> Generado sintéticamente

<400> 28

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

ES 2 608 690 T3

Gln Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Val Ser Ala Asp Cys Val Ser Leu
 195 200 205

Thr Gly Ala Val Ser Leu Ala Ser Met Leu Thr Glu Ile Phe Leu Leu
 210 215 220

Gln His Ala Gln Gly Met Pro Glu Pro Gly Trp Gly Arg Ile Thr Asp
 225 230 235 240

Ser His Gln Trp Asn Thr Leu Leu Ser Leu His Asn Ala His Phe Asp
 245 250 255

Leu Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser Arg Ala Thr Pro Leu
 260 265 270

Leu Asp Leu Ile Lys Thr Ala Leu Thr Pro His Pro Pro Gln Lys Gln
 275 280 285

Ala Tyr Gly Val Thr Leu Pro Thr Ser Val Leu Phe Ile Ala Gly His
 290 295 300

Asp Thr Asn Leu Ala Asn Leu Gly Gly Ala Leu Glu Leu Glu Trp Thr
 305 310 315 320

Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Glu Leu Val Phe
 325 330 335

Glu Arg Trp Arg Arg Leu Ser Asp Asn Ser Gln Trp Ile Gln Val Ser
 340 345 350

Leu Val Phe Gln Thr Leu Gln Gln Met Arg Asp Lys Thr Pro Leu Ser
 355 360 365

Leu Asn Thr Pro Pro Gly Glu Val Lys Leu Thr Leu Ala Gly Cys Glu
 370 375 380

Glu Arg Asn Ala Gln Gly Met Cys Ser Leu Ala Gly Phe Thr Gln Ile
 385 390 395 400

Val Asn Glu Ala Arg Ile Pro Ala Cys Ser Leu
 405 410

<210> 29

< 211> 1236

< 212> ADN

< 213> Secuencia artificial

5

<220>

< 223> Generado sintéticamente

<400> 29

ES 2 608 690 T3

```

    --- --
atgcagagtg agccggagct gaagctggaa agtgtggtga ttgtcagtcg tcatggtgtg      60
cgtgctccaa ccaagggcac gcaactgatg caggatgtca cccagacgc atggccaacc      120
tggccggtaa aactgggtga gctgacaccg cgcggtggtg agctaatacgc ctatctcggg      180
cattactggc gtcagcgtct ggtageccgc ggattgtctc ctaaattgtg ctgcccgacg      240
tctggtcagg tcgcgattat tgctgatgtc gacgagcgtc cccgtaaaac aggcgaagcc      300
ttcgccgccc ggctggcacc tgactgtgca ataaccgtac ataccaggc agatacgtcc      360
agtcccgatc cgttatttaa tctctaaaa actggcgttt gccaaactgga taacgcgaac      420
gtgagagacg cgatcctcga gagggcagga gggtaattg ctgactttac cgggcattat      480
caaacggcgt ttcgcgaact ggaacgggtg cttaatcttc cgcaatcaaa cttgtgcctt      540
aaacgtgaga aacaggacga aagctgttca ttaacgcagg cattaccatc ggaactcaag      600
gtgagcggcg actgtgtctc attaacgggt gcgtaagcc tcgcatcaat gctgacggag      660
atatttctcc tgcaacatgc acagggaatg ccggagccgg ggtggggaag gatcaccgat      720
tcacaccagt ggaacacctt gctaagtttg cataacgcgc aatttgattt gctacaacgc      780
acgccagagg ttgcccgacg ccgcgccacc ccgttattag attgatcaa gacagcgttg      840
acgccccatc caccgcaaaa acaggggatg ggtgtgacat taccacttc agtgctgttt      900
atcgccggac acgatactaa tctggcaaat ctcgccggcg cactggagct cgaatggacg      960
cttcccggtc agccggataa cacgccgcca ggtggtgaac tgggtgttga acgctggcgt     1020
cggctaagcg ataacagcca gtggattcag gtttcgctgg tcttccagac tttacagcag     1080
atgctgata aaacgccgt gtcattaat acgccgccg gagagtgaa actgaccctg     1140
gcaggatgtg aagagcgaag tgcgcagggc atgtgttcgt tggcagggtt tacgcaaatc     1200
gtgaatgaag cacgcatacc ggcgtgcagt ttgtaa                                  1236

```

<210> 30
 < 211> 411
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

5

<220>
 < 223> Generado sintéticamente

<400> 30
 Met Gln Ser Glu Pro Glu Leu Lys Leu Glu Ser Val Val Ile Val Ser
 1 5 10 15

 Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Ala Thr Gln Leu Met Gln Asp
 20 25 30

10

ES 2 608 690 T3

Val Thr Pro Asp Ala Trp Pro Thr Trp Pro Val Lys Leu Gly Glu Leu
 35 40 45
 Thr Pro Arg Gly Gly Glu Leu Ile Ala Tyr Leu Gly His Tyr Trp Arg
 50 55 60
 Gln Arg Leu Val Ala Asp Gly Leu Leu Pro Lys Cys Gly Cys Pro Gln
 65 70 75 80
 Ser Gly Gln Val Ala Ile Ile Ala Asp Val Asp Glu Arg Thr Arg Lys
 85 90 95
 Thr Gly Glu Ala Phe Ala Ala Gly Leu Ala Pro Asp Cys Ala Ile Thr
 100 105 110
 Val His Thr Gln Ala Asp Thr Ser Ser Pro Asp Pro Leu Phe Asn Pro
 115 120 125
 Leu Lys Thr Gly Val Cys Gln Leu Asp Asn Ala Asn Val Arg Asp Ala
 130 135 140
 Ile Leu Glu Arg Ala Gly Gly Ser Ile Ala Asp Phe Thr Gly His Tyr
 145 150 155 160
 Gln Thr Ala Phe Arg Glu Leu Glu Arg Val Leu Asn Phe Pro Gln Ser
 165 170 175
 Asn Leu Cys Leu Lys Arg Glu Lys Gln Asp Glu Ser Cys Ser Leu Thr
 180 185 190
 Gln Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Val Ser Ala Asp Cys Val Ser Leu
 195 200 205
 Thr Gly Ala Val Ser Leu Ala Ser Met Leu Thr Glu Ile Phe Leu Leu
 210 215 220
 Gln His Ala Gln Gly Met Pro Glu Pro Gly Trp Gly Arg Ile Thr Asp
 225 230 235 240
 Ser His Gln Trp Asn Thr Leu Leu Ser Leu His Asn Ala Gln Phe Asp
 245 250 255
 Leu Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser Arg Ala Thr Pro Leu
 260 265 270
 Leu Asp Leu Ile Lys Thr Ala Leu Thr Pro His Pro Pro Gln Lys Gln

ES 2 608 690 T3

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

<210> 31

< 211> 1236

< 212> ADN

< 213> Secuencia artificial

5

<220>

< 223> Generado sintéticamente

<400> 31

atgcagagtg agccggagct gaagctggaa agtgtggtga ttgtcagtcg tcatggtgtg	60
cgtgctccaa ccaaggccat gcaactgatg caggatgtca cccagacgc atggccaacc	120
tggccggtaa aactgggtga gctgacaccg cgcggtggtg agctaatcgc ctatctcga	180
cattactggc gtcagcgtct ggtagccgac ggattgctgc ctaaattgtg ctgcccgcag	240
tctgttcagg tcgcgattat tgctgatgtc gacgagcgtc cccgtaaac aggcgaagcc	300
ttcgcgcgog ggctggcacc tgactgtgca ataaccgtac ataccaggc agatacgtcc	360
agtcccgatc cgttatttaa tcctctaaaa actggcgttt gccaaactgga tgtggcgaac	420
gtgagagacg cgatcctcga gagggcagga gggcgaattg ctgactttac cgggcattat	480
caaacggcgt ttcgcgaact ggaacgggtg cttaattttc cgcaatcaaa cttgtgcctt	540
aaacgtgaga aacaggacga aagctgttca ttaacgcagg cattaccatc ggaactcaag	600

10

ES 2 608 690 T3

gtgagcgccg actgtgtctc attaaccggt gcggttaagcc tcgcatcaat gctgacggag 660
atatttctcc tgcaacatgc acagggaaatg ccggagccgg ggtggggaag gatcaccgat 720
tcacaccagt ggaacacctt gctaagtttg cataacgcgg tgtttgattt gctacaacgc 780
acgccagagg ttgcccgag ccgcccacc ccgttattag atttgatcaa gacagcgttg 840
acgccccatc caccgcaaaa acagggcgtat ggtgtgacat taccacttc agtgctgttt 900
atcgccggac acgataacta tctggcaaat ctcgccggcg cactggagct cgaatggacg 960
cttcccggtc agccggataa cacgccgcca ggtggtgaac tgggttttga acgctggcgt 1020
cggctaagcg ataacagcca gtggattcag gtttcgctgg tcttcagac tttacagcag 1080
atgctgata aaacgcgct gtcattaaat acgccgcccg gagagtgaa actgaccctg 1140
gcagatgtg aagagcgaaa tgcgcagggc atgtgttcgt tggcaggtt tacgcaaatc 1200
gtgaatgaag cacgcatacc ggcgtgcagt ttgtaa 1236

<210> 32

< 211> 411

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

5

<220>

< 223> Generado sintéticamente

<400> 32

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

10

ES 2 608 690 T3

115 120 125

Leu Lys Thr Gly Val Cys Gln Leu Asp Val Ala Asn Val Arg Asp Ala
130 135 140

Ile Leu Glu Arg Ala Gly Gly Ser Ile Ala Asp Phe Thr Gly His Tyr
145 150 155 160

Gln Thr Ala Phe Arg Glu Leu Glu Arg Val Leu Asn Phe Pro Gln Ser
165 170 175

Asn Leu Cys Leu Lys Arg Glu Lys Gln Asp Glu Ser Cys Ser Leu Thr
180 185 190

Gln Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Val Ser Ala Asp Cys Val Ser Leu
195 200 205

Thr Gly Ala Val Ser Leu Ala Ser Met Leu Thr Glu Ile Phe Leu Leu
210 215 220

Gln His Ala Gln Gly Met Pro Glu Pro Gly Trp Gly Arg Ile Thr Asp
225 230 235 240

Ser His Gln Trp Asn Thr Leu Leu Ser Leu His Asn Ala Val Phe Asp
245 250 255

Leu Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser Arg Ala Thr Pro Leu
260 265 270

Leu Asp Leu Ile Lys Thr Ala Leu Thr Pro His Pro Pro Gln Lys Gln
275 280 285

Ala Tyr Gly Val Thr Leu Pro Thr Ser Val Leu Phe Ile Ala Gly His
290 295 300

Asp Thr Asn Leu Ala Asn Leu Gly Gly Ala Leu Glu Leu Glu Trp Thr
305 310 315 320

Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Glu Leu Val Phe
325 330 335

Glu Arg Trp Arg Arg Leu Ser Asp Asn Ser Gln Trp Ile Gln Val Ser
340 345 350

Leu Val Phe Gln Thr Leu Gln Gln Met Arg Asp Lys Thr Pro Leu Ser
355 360 365

Leu Asn Thr Pro Pro Gly Glu Val Lys Leu Thr Leu Ala Gly Cys Glu
370 375 380

Glu Arg Asn Ala Gln Gly Met Cys Ser Leu Ala Gly Phe Thr Gln Ile
385 390 395 400

Val Asn Glu Ala Arg Ile Pro Ala Cys Ser Leu
405 410

<210> 33
 < 211> 1236
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia artificial

5 <220>
 < 223> Generado sintéticamente

<400> 33
 atgcagagtg agccggagct gaagctggaa agtgtggtga ttgtcagtcg tcatggtgtg 60
 cgtgctccaa ccaaggccat gcaactgatg caggatgtca ccccagacgc atggccaacc 120
 tggccggtaa aactgggtga gctgacaccg cgcggtggtg agctaatcgc ctatctcgga 180
 cactactggc gtcagcgtct ggtagccgac ggattgctgc ctaaagtgtg ctgcccgcag 240
 tctggtcagg tcgcgattat tgctgatgtc gacgagcgtc cccgtaaac aggcgaagcc 300
 ttcgccgccg ggctggcacc tgactgtgca ataaccgtac ataccaggc agatacgtcc 360
 agtcccgatc cgttatttaa tcctctaaaa actggcgttt gccaaactgga tgtggcgaac 420
 gtgagacgtg cgatcctcga gagggcagga ggggtcaattg ctgactttac cgggcattat 480
 caaacggcgt ttcgcgaact ggaacgggtg cttaattttc cgcaatcaa cttgtgcctt 540
 aaacgtgaga aacaggacga aagctgttca ttaacgcagg cattaccatc ggaactcaag 600
 gtgagcgccg actgtgtctc attaaccggt gcgtaagcc tcgcatcaat gctgacggag 660
 atatttctcc tgcaacatgc acagggaatg ccggagccgg ggtggggaag gatcaccgat 720
 tcacaccagt ggaacacctt gctaagtttg cataacgcgg tgtttgattt gctacaacgc 780
 acgccagagg ttgccgcag ccgcgccacc ccgttattag atttgatcaa gacagcgttg 840
 acgccccatc caccgcaaaa acagggcgtat ggtgtgacat taccacttc agtgctgttt 900
 atcgccggac acgatactaa tctggcaaat ctcgccggcg cactggagct cgaatggacg 960
 cttcccggtc agccggataa cacgccgcca ggtggtgaac tgggtgttga acgctggcgt 1020
 cggctaagcg ataacagcca gtggattcag gtttcgctgg tcttcagac ttacagcag 1080
 atgctgata aaacgccgct gtcattaat acgccgccg gagaggtgaa actgaccctg 1140
 gcaggatgtg aagagcgaaa tgccgagggc atgtgttcgt tggcagggtt tacgcaaatc 1200
 gtgaatgaag cacgcacacc ggcgtgcagt ttgtaa 1236

10 <210> 34
 < 211> 411
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

<220>
 < 223> Generado sintéticamente

15 <400> 34

ES 2 608 690 T3

Met Gln Ser Glu Pro Glu Leu Lys Leu Glu Ser Val Val Ile Val Ser
 1 5 10 15

Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Ala Met Gln Leu Met Gln Asp
 20 25 30

Val Thr Pro Asp Ala Trp Pro Thr Trp Pro Val Lys Leu Gly Glu Leu
 35 40 45

Thr Pro Arg Gly Gly Glu Leu Ile Ala Tyr Leu Gly His Tyr Trp Arg
 50 55 60

Gln Arg Leu Val Ala Asp Gly Leu Leu Pro Lys Cys Gly Cys Pro Gln
 65 70 75 80

Ser Gly Gln Val Ala Ile Ile Ala Asp Val Asp Glu Arg Thr Arg Lys
 85 90 95

Thr Gly Glu Ala Phe Ala Ala Gly Leu Ala Pro Asp Cys Ala Ile Thr
 100 105 110

Val His Thr Gln Ala Asp Thr Ser Ser Pro Asp Pro Leu Phe Asn Pro
 115 120 125

Leu Lys Thr Gly Val Cys Gln Leu Asp Val Ala Asn Val Arg Arg Ala
 130 135 140

Ile Leu Glu Arg Ala Gly Gly Ser Ile Ala Asp Phe Thr Gly His Tyr
 145 150 155 160

Gln Thr Ala Phe Arg Glu Leu Glu Arg Val Leu Asn Phe Pro Gln Ser
 165 170 175

Asn Leu Cys Leu Lys Arg Glu Lys Gln Asp Glu Ser Cys Ser Leu Thr
 180 185 190

Gln Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Val Ser Ala Asp Cys Val Ser Leu
 195 200 205

ES 2 608 690 T3

Thr Gly Ala Val Ser Leu Ala Ser Met Leu Thr Glu Ile Phe Leu Leu
 210 215 220

Gln His Ala Gln Gly Met Pro Glu Pro Gly Trp Gly Arg Ile Thr Asp
 225 230 235 240

Ser His Gln Trp Asn Thr Leu Leu Ser Leu His Asn Ala Val Phe Asp
 245 250 255

Leu Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser Arg Ala Thr Pro Leu
 260 265 270

Leu Asp Leu Ile Lys Thr Ala Leu Thr Pro His Pro Pro Gln Lys Gln
 275 280 285

Ala Tyr Gly Val Thr Leu Pro Thr Ser Val Leu Phe Ile Ala Gly His
 290 295 300

Asp Thr Asn Leu Ala Asn Leu Gly Gly Ala Leu Glu Leu Glu Trp Thr
 305 310 315 320

Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Glu Leu Val Phe
 325 330 335

Glu Arg Trp Arg Arg Leu Ser Asp Asn Ser Gln Trp Ile Gln Val Ser
 340 345 350

Leu Val Phe Gln Thr Leu Gln Gln Met Arg Asp Lys Thr Pro Leu Ser
 355 360 365

Leu Asn Thr Pro Pro Gly Glu Val Lys Leu Thr Leu Ala Gly Cys Glu
 370 375 380

Glu Arg Asn Ala Gln Gly Met Cys Ser Leu Ala Gly Phe Thr Gln Ile
 385 390 395 400

Val Asn Glu Ala Arg Thr Pro Ala Cys Ser Leu
 405 410

<210> 35

< 211> 1236

< 212> ADN

5 < 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Generado sintéticamente

<400> 35

atgcagagtg agccggagct gaagctggaa agtgtggtga ttgtcagtcg tcatggtgtg

60

10

ES 2 608 690 T3

cgtgctccaa ccaaggccat gcaactgatg caggatgtca ccccagacgc atggccaacc 120
 tggccggtaa aactgggtga gctgacaccg cgcggtggtg agctaacgc ctatctcgga 180
 cactactggc gtcagcgtct ggtagccgac ggattgctgc ctaaagtgg ctgcccgcag 240
 tctggtcagg tcgcgattat tgctgatgtc gacgagcgtc cccgtaaac aggcgaagcc 300
 ttcgccgccg ggctggcacc tgactgtgca ataaccgtac ataccaggc agatacgtcc 360
 agtcccgatc cgttatattaa tcctctaaaa actggcgttt gccaaactgga tgtggcgaac 420
 gtgagacgtg cgatcctcga gagggcagga ggggtcaattg ctgactttac cgggcattat 480
 caaacggcgt ttcgcgaact ggaacgggtg cttaattttc cgcaatcaaa cttgtgcctt 540
 aaacgtgaga aacaggacga aagctgttca ttaacgcagg cattaccatc ggaactcaag 600
 gtgagcgcgc actgtgtctc attaaccggt gcggtgaagc tcgcatcaat gctgacggag 660
 atatttctcc tgcaacatgc acagggaatg ccggagcccg ggtggggaag gatcaccgat 720
 tcacaccagt ggaacacctt gctaagttag cataacgcgc aatttgattt gctacaacgc 780
 acgccagagg ttgcccgag ccgcgccacc ccgttattag atttgatcaa gacagcgttg 840
 acgccccatc caccgcaaaa acaggcgat ggtgtgacat taccacttc agtgctgttt 900
 atcgccggac acgatactaa tctggcaaat ctcgccggcg cactggagct cgaatggacg 960
 cttcccggtc agccggataa cacgccgcca ggtggtgaac tgggtgttga acgctggcgt 1020
 cggctaagcg ataacagcca gtggattcag gtttcgctgg tcttccagac ttacagcag 1080
 atgctgata aaacgccgct gtcattaaat acgccgcccg gagaggtgaa actgaccctg 1140
 gcaggatgtg aagagcgaaa tgccgagggc atgtgttcgt tggcagggtt tacgcaaatc 1200
 gtgaatgaag cacgcatacc ggcgtgcagt ttgtaa 1236

<210> 36

< 211> 411

< 212> PRT

5 < 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Generado sintéticamente

<400> 36

Met Gln Ser Glu Pro Glu Leu Lys Leu Glu Ser Val Val Ile Val Ser
 1 5 10 15

Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Ala Met Gln Leu Met Gln Asp
 20 25 30

Val Thr Pro Asp Ala Trp Pro Thr Trp Pro Val Lys Leu Gly Glu Leu
 35 40 45

10

ES 2 608 690 T3

Thr Pro Arg Gly Gly Glu Leu Ile Ala Tyr Leu Gly His Tyr Trp Arg
 50 55 60

Gln Arg Leu Val Ala Asp Gly Leu Leu Pro Lys Cys Gly Cys Pro Gln
 65 70 75 80

Ser Gly Gln Val Ala Ile Ile Ala Asp Val Asp Glu Arg Thr Arg Lys
 85 90 95

Thr Gly Glu Ala Phe Ala Ala Gly Leu Ala Pro Asp Cys Ala Ile Thr
 100 105 110

Val His Thr Gln Ala Asp Thr Ser Ser Pro Asp Pro Leu Phe Asn Pro
 115 120 125

Leu Lys Thr Gly Val Cys Gln Leu Asp Val Ala Asn Val Arg Arg Ala
 130 135 140

Ile Leu Glu Arg Ala Gly Gly Ser Ile Ala Asp Phe Thr Gly His Tyr
 145 150 155 160

Gln Thr Ala Phe Arg Glu Leu Glu Arg Val Leu Asn Phe Pro Gln Ser
 165 170 175

Asn Leu Cys Leu Lys Arg Glu Lys Gln Asp Glu Ser Cys Ser Leu Thr
 180 185 190

Gln Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Val Ser Ala Asp Cys Val Ser Leu
 195 200 205

Thr Gly Ala Val Ser Leu Ala Ser Met Leu Thr Glu Ile Phe Leu Leu
 210 215 220

Gln His Ala Gln Gly Met Pro Glu Pro Gly Trp Gly Arg Ile Thr Asp
 225 230 235 240

Ser His Gln Trp Asn Thr Leu Leu Ser Leu His Asn Ala Gln Phe Asp
 245 250 255

Leu Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser Arg Ala Thr Pro Leu
 260 265 270

Leu Asp Leu Ile Lys Thr Ala Leu Thr Pro His Pro Pro Gln Lys Gln
 275 280 285

Ala Tyr Gly Val Thr Leu Pro Thr Ser Val Leu Phe Ile Ala Gly His
 290 295 300

ES 2 608 690 T3

Asp Thr Asn Leu Ala Asn Leu Gly Gly Ala Leu Glu Leu Glu Trp Thr
305 310 315 320

Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Glu Leu Val Phe
325 330 335

Glu Arg Trp Arg Arg Leu Ser Asp Asn Ser Gln Trp Ile Gln Val Ser
340 345 350

Leu Val Phe Gln Thr Leu Gln Gln Met Arg Asp Lys Thr Pro Leu Ser
355 360 365

Leu Asn Thr Pro Pro Gly Glu Val Lys Leu Thr Leu Ala Gly Cys Glu
370 375 380

Glu Arg Asn Ala Gln Gly Met Cys Ser Leu Ala Gly Phe Thr Gln Ile
385 390 395 400

Val Asn Glu Ala Arg Ile Pro Ala Cys Ser Leu
405 410

<210> 37

< 211> 1236

< 212> ADN

< 213> Secuencia artificial

5

<220>

< 223> Generado sintéticamente

<400> 37

atgcagagtg agccggagct gaagctggaa agtgtggtga ttgtcagtcg tcatggtgtg	60
cgtgctccaa ccaaggccat gcaactgatg caggatgtca cccagacgc atggccaacc	120
tggccggtaa aactgggtga gctgacaccg cgcggtggtg agctaatcgc ctatctcggg	180
cattactggc gtcagcgtct ggtagccgac ggattgctgc ctaaattgtg ctgcccgcag	240
tctggtcagg tcgcgattat tgctgatgac gacgagcgtc cccgtaaaac aggcgaagcc	300
ttcggcccg ggtggcacc tgactgtgca ataaccgtac ataccaggc agatacgtcc	360
agtcccgatc cgttatttaa tcctctaaaa actggcggtt gccaaactgga tgtggcgaac	420
gtgagagacg cgaacccgga gagggcagga gggcgaattg ctgactttac cgggcattat	480
caaacggcgt ttcgccaact ggaacgggtg cttaattttc cgcaatcaaa cttgtgcctt	540
aaacgtgaga aacaggacga aagctgttca ttaacgcagg cattaccatc ggaactcaag	600
gtgagcgcg actgtgtctc attaaccggt gcggtaaagc tcgcatcaat gctgacggag	660
atatttctcc tgcaacatgc acagggaatg ccggagccgg ggtggggaag gatcaccgat	720
tcacaccagt ggaacacctt gctaagtttg cataacgcgg tgtttgattt gctacaacgc	780

10

ES 2 608 690 T3

acgccagagg ttgccgcag ccgcccacc ccgttattag atttgatcaa gacagcgttg 840
 acgccccatc caccgcaaaa acaggcgtat ggtgtgacat taccacttc agtgctgttt 900
 atcgccggac acgatactaa tctggcaaat ctccggcgcg cactggagct cgaatggacg 960
 cttcccgtc agccggataa cagcccgcca ggtgtggaac tgggtgttga acgctggcgt 1020
 cggctaagcg ataacagcca gtggattcag gtttcgctgg tcttccagac ttacagcag 1080
 atgctgata aaacgccgct gtcattaaat acgccgccg gagagtgaa actgaccctg 1140
 gcaggatgtg aagagcgaaa tgcgcagggc atgtgttcgt tggcaggttt tacgcaaatc 1200
 gtgaatgaag cacgcacacc ggcgtgcagt ttgtaa 1236

<210> 38

< 211> 411

< 212> PRT

5 < 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Generado sintéticamente

<400> 38

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

10

ES 2 608 690 T3

Ile Leu Glu Arg Ala Gly Gly Ser Ile Ala Asp Phe Thr Gly His Tyr
 145 150 155 160

Gln Thr Ala Phe Arg Glu Leu Glu Arg Val Leu Asn Phe Pro Gln Ser
 165 170 175

Asn Leu Cys Leu Lys Arg Glu Lys Gln Asp Glu Ser Cys Ser Leu Thr
 180 185 190

Gln Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Val Ser Ala Asp Cys Val Ser Leu
 195 200 205

Thr Gly Ala Val Ser Leu Ala Ser Met Leu Thr Glu Ile Phe Leu Leu
 210 215 220

Gln His Ala Gln Gly Met Pro Glu Pro Gly Trp Gly Arg Ile Thr Asp
 225 230 235 240

Ser His Gln Trp Asn Thr Leu Leu Ser Leu His Asn Ala Val Phe Asp
 245 250 255

Leu Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser Arg Ala Thr Pro Leu
 260 265 270

Leu Asp Leu Ile Lys Thr Ala Leu Thr Pro His Pro Pro Gln Lys Gln
 275 280 285

Ala Tyr Gly Val Thr Leu Pro Thr Ser Val Leu Phe Ile Ala Gly His
 290 295 300

Asp Thr Asn Leu Ala Asn Leu Gly Gly Ala Leu Glu Leu Glu Trp Thr
 305 310 315 320

Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Glu Leu Val Phe
 325 330 335

Glu Arg Trp Arg Arg Leu Ser Asp Asn Ser Gln Trp Ile Gln Val Ser
 340 345 350

Leu Val Phe Gln Thr Leu Gln Gln Met Arg Asp Lys Thr Pro Leu Ser
 355 360 365

Leu Asn Thr Pro Pro Gly Glu Val Lys Leu Thr Leu Ala Gly Cys Glu
 370 375 380

Glu Arg Asn Ala Gln Gly Met Cys Ser Leu Ala Gly Phe Thr Gln Ile
 385 390 395 400

Val Asn Glu Ala Arg Thr Pro Ala Cys Ser Leu
 405 410

<210> 39
 < 211> 1236
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Generado sintéticamente

<400> 39

atgcagagtg agccggagct gaagctggaa agtgtggtga ttgtcagtcg tcatggtgtg	60
cgtgctccaa ccaaggccat gcaactgatg caggatgtca cccagacgc atggccaacc	120
tggccggtaa aactgggtga gctgacaccg cgcggtggtg agctaacgc ctatctcga	180
cattactggc gtcagcgtct ggtagccgac ggattgctgc ctaaagtgg ctgcccgac	240
tctggtcagg tcgcgattat tgctgatgtc gacgagcgtc cccgtaaac aggcgaagcc	300
ttcgccgccg ggctggcacc tgactgtgca ataaccgtac ataccaggc agatacgtcc	360
agtcccgatc cgttatatta tccctctaaa actggcgttt gccaaactgga tgtggcgaac	420
gtgagacgtg cgtcctcga gagggcagga gggcaattg ctgactttac ccgccattat	480
caaacggcgt ttcgcgaact ggaacgggtg cttaattttc cgcaatcaa cttgtgcctt	540
aaacgtgaga aacaggacga aagctgttca ttaacgcagg cattaccatc ggaactcaag	600
gtgagcgccg acgatgtctc attaaccggt gcgtaagcc tcgcatcaat gctgacggag	660
atatttctcc tgtggcatgc acagggaatg ccggagccgg ggtggggaag gatcaccgat	720
tcacaccagt ggaacacctt gctaagtttg cataacgcgg tgtttgattt gctacaacgc	780
acgccagagg ttgcccgac cgcgccacc ccgttattag atttgatcaa gacagcgttg	840
acgccccatc caccgcaaaa acagggctat ggtgtgacat taccacttc agtgcgtttt	900
atcgccggac acgatactaa tctggcaaat ctcgccggcg cactggagct cgaatggacg	960
cttcccggtc agccggataa cacgccgcca ggtggtgaac tgggtgttga acgctggcgt	1020
cggctaagcg ataacagcca gtggattcag gtttcgctgg tcttcagac ttacagcag	1080
atgctgata aaacgccgct gtcattaaat acgccgccg gagaggtgaa actgaccctg	1140
gcaggatgtg aagagcgaaa tgccgagggc atgtgttcgt tggcaggtt tacgcaaatc	1200
gtgaatgaag cacgcatacc ggcgtgcagt ttgtaa	1236

5

<210> 40

< 211> 411

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

ES 2 608 690 T3

<220>

<223> Generado sintéticamente

<400> 40

Met Gln Ser Glu Pro Glu Leu Lys Leu Glu Ser Val Val Ile Val Ser
 1 5 10 15

Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Ala Met Gln Leu Met Gln Asp
 20 25 30

Val Thr Pro Asp Ala Trp Pro Thr Trp Pro Val Lys Leu Gly Glu Leu
 35 40 45

Thr Pro Arg Gly Gly Glu Leu Ile Ala Tyr Leu Gly His Tyr Trp Arg
 50 55 60

Gln Arg Leu Val Ala Asp Gly Leu Leu Pro Lys Cys Gly Cys Pro Gln
 65 70 75 80

Ser Gly Gln Val Ala Ile Ile Ala Asp Val Asp Glu Arg Thr Arg Lys
 85 90 95

Thr Gly Glu Ala Phe Ala Ala Gly Leu Ala Pro Asp Cys Ala Ile Thr
 100 105 110

Val His Thr Gln Ala Asp Thr Ser Ser Pro Asp Pro Leu Phe Asn Pro
 115 120 125

Leu Lys Thr Gly Val Cys Gln Leu Asp Val Ala Asn Val Arg Arg Ala
 130 135 140

Ile Leu Glu Arg Ala Gly Gly Ser Ile Ala Asp Phe Thr Arg His Tyr
 145 150 155 160

Gln Thr Ala Phe Arg Glu Leu Glu Arg Val Leu Asn Phe Pro Gln Ser
 165 170 175

Asn Leu Cys Leu Lys Arg Glu Lys Gln Asp Glu Ser Cys Ser Leu Thr
 180 185 190

Gln Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Val Ser Ala Asp Asp Val Ser Leu
 195 200 205

Thr Gly Ala Val Ser Leu Ala Ser Met Leu Thr Glu Ile Phe Leu Leu
 210 215 220

Trp His Ala Gln Gly Met Pro Glu Pro Gly Trp Gly Arg Ile Thr Asp
 225 230 235 240

ES 2 608 690 T3

Ser His Gln Trp Asn Thr Leu Leu Ser Leu His Asn Ala Val Phe Asp
 245 250 255

Leu Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser Arg Ala Thr Pro Leu
 260 265 270

Leu Asp Leu Ile Lys Thr Ala Leu Thr Pro His Pro Pro Gln Lys Gln
 275 280 285

Ala Tyr Gly Val Thr Leu Pro Thr Ser Val Leu Phe Ile Ala Gly His
 290 295 300

Asp Thr Asn Leu Ala Asn Leu Gly Gly Ala Leu Glu Leu Glu Trp Thr
 305 310 315 320

Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Glu Leu Val Phe
 325 330 335

Glu Arg Trp Arg Arg Leu Ser Asp Asn Ser Gln Trp Ile Gln Val Ser
 340 345 350

Leu Val Phe Gln Thr Leu Gln Gln Met Arg Asp Lys Thr Pro Leu Ser
 355 360 365

Leu Asn Thr Pro Pro Gly Glu Val Lys Leu Thr Leu Ala Gly Cys Glu
 370 375 380

Glu Arg Asn Ala Gln Gly Met Cys Ser Leu Ala Gly Phe Thr Gln Ile
 385 390 395 400

Val Asn Glu Ala Arg Ile Pro Ala Cys Ser Leu
 405 410

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico aislado, sintético o recombinante que comprende:

(i) una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una actividad fitasa y que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% o más de identidad de secuencia con SEC ID N^o: 1, donde el polipéptido comprende la mutación Q247H; o

(ii) un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una actividad fitasa y que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% o más de identidad de secuencia con SEC ID N^o: 2, donde el polipéptido comprende la mutación Q247H;

donde dicho polipéptido de (i) o (ii) tiene una termotolerancia superior o igual a la de la secuencia parental no mutada, así como también una labilidad gástrica mayor que la de la secuencia parental.

2. El ácido nucleico aislado, sintético o recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, donde el polipéptido comprende la mutación Q247H y al menos un par de mutaciones adicionales, donde el par de mutaciones adicionales se selecciona entre:

N161K y N339E; N161K y T341D; T163R y N339E; y T163R y T341D.

3. El ácido nucleico aislado, sintético o recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, donde el polipéptido comprende la mutación Q247H y al menos una mutación adicional, donde dicha al menos una mutación adicional se selecciona entre: A109V, A232P, A236H, A236T, A248L, A248T, A274F, A274I, A274L, A274T, A274V, A429P, C155Y, D139Y, E113P, F147Y, F194L, G171M, G171S, G257A, G257R, G353C, G395E, G395I, G395L, G395Q, G395T, G67A, H263P, H272W, I107H, I107P, I108A, I108Q, I108R, I108S, I108Y, I174F, I174P, I427G, I427S, I427T, K151H, K151P, L126R, L146R, L146T, L150T, L150Y, L157C, L157P, L167S, L192F, L216T, L235I, L244S, L269I, L269T, L296T, L379S, L379V, L50W, M51A, M51G, M51L, N148K, N148M, N148R, N161K, N266P, N339E, N348K, N348W, P100A, P145L, P149L, P149N, P217D, P217G, P217L, P217S, P254S, P269L, P343E, P343I, P343L, P343N, P343R, P343V, Q137F, Q137L, Q137V, Q137Y, Q246W, Q275H, Q309P, Q377R, Q381S, Q86H, S102A, S102Y, S173G, S173H, S173V, S197G, S208P, S211H, S218I, S218Y, S389H, S389V, T163P, T282H, T291V, T291W, T341D, T48F, T48H, T48I, T48K, T48L, T48M, T48V, T48W, T48Y, V162L, V162T, V191A, V422M, W265L, Y79H, Y79N, Y79S o Y79W; y cualquier combinación de las mismas.

4. El ácido nucleico de la reivindicación 3, donde el polipéptido comprende además al menos una mutación adicional, donde la mutación adicional se selecciona entre: C226D, D164R, G179R, N159V, Q275V, T163R y T349Y.

5. Un casete de expresión, un vector, un vehículo de clonación, un vector de expresión o un vector de clonación que comprende el ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

6. Una célula transformada o una célula huésped aislada que comprende el ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

7. Un polipéptido fitasa aislado, sintético o recombinante que comprende

(i) una secuencia de aminoácidos codificada por el ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2; o

(ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con SEC ID N^o: 2, donde el polipéptido comprende la mutación Q247H, donde dicho polipéptido de (i) o (ii) tiene una termotolerancia superior o igual a la de la secuencia parental no mutada, así como también una labilidad gástrica mayor que la de la secuencia parental.

8. El polipéptido fitasa aislado, sintético o recombinante de la reivindicación 7, donde el polipéptido comprende además al menos una mutación adicional, donde la mutación adicional:

(a) se selecciona entre N161K y N339E; N161K y T341D; T163R y N339E; y T163R y T341D;

(b) se selecciona entre las mutaciones: A109V, A232P, A236H, A236T, A248L, A248T, A274F, A274I, A274L, A274T, A274V, A429P, C155Y, D139Y, E113P, F147Y, F194L, G171M, G171S, G257A, G257R, G353C, G395E, G395I, G395L, G395Q, G395T, G67A, H263P, H272W, I107H, I107P, I108A, I108Q, I108R, I108S, I108Y, I174F, I174P, I427G, I427S, I427T, K151H, K151P, L126R, L146R, L146T, L150T, L150Y, L157C, L157P, L167S, L192F, L216T, L235I, L244S, L269I, L269T, L296T, L379S, L379V, L50W, M51A, M51G, M51L, N148K, N148M, N148R, N161K, N266P, N339E, N348K, N348W, P100A, P145L, P149L, P149N, P217D, P217G, P217L, P217S, P254S, P269L, P343E, P343I, P343L, P343N, P343R, P343V, Q137F, Q137L, Q137V, Q137Y, Q246W, Q275H, Q309P, Q377R, Q381S, Q86H, S102A, S102Y, S173G, S173H, S173V, S197G, S208P, S211H, S218I, S218Y, S389H, S389V, T163P, T282H, T291V, T291W, T341D, T48F, T48H, T48I, T48K, T48L, T48M, T48V, T48W, T48Y, V162L, V162T, V191A, V422M, W265L, Y79H, Y79N, Y79S o Y79W y cualquier combinación de las mismas; o

(c) el polipéptido de (b), donde el polipéptido comprende además al menos una mutación adicional seleccionada entre: C226D, D164R, G179R, N159V, Q275V, T163R y T349Y.

9. Una preparación proteica que comprende el polipéptido de la reivindicación 7 u 8, donde la preparación proteica comprende un líquido, una pasta espesa, un polvo, un aerosol, una suspensión, una composición/formulación liofilizada, un sólido, un comprimido recubierto con película, una píldora, un implante, un gel; o una formulación farmacéutica, un alimento o un pienso o un complemento de los mismos.
- 5 10. Un heterodímero: (i) que comprende el polipéptido de la reivindicación 7 u 8 y un segundo dominio; o (ii) el heterodímero de (i), donde el segundo dominio es un polipéptido y el heterodímero es una proteína de fusión, y/o el segundo dominio es un epítipo o un marcador.
- 10 11. El polipéptido de la reivindicación 7 u 8, donde el polipéptido está inmovilizado sobre o dentro de una célula, una vesícula, un liposoma, una película, una membrana, un metal, una resina, un polímero, una cerámica, un vidrio, un microelectrodo, una partícula gráfica, una perla, un gel, una placa, una matriz, un tubo capilar, un cristal, un comprimido, una píldora, una cápsula, un polvo, un aglomerado, una superficie o una estructura porosa.
- 15 12. Un método para hidrolizar un hexafosfato de inositol a inositol y fosfato inorgánico que comprende:
(a) proporcionar el polipéptido de la reivindicación 7 u 8; (b) proporcionar una composición que comprenda un hexafosfato de inositol; y (c) poner en contacto el polipéptido de (a) con la composición de (b) en condiciones donde el polipéptido hidrolice el hexafosfato de inositol para producir inositol y fosfato inorgánico.
- 20 13. Un método para desgomar aceites que comprende: (a) proporcionar el polipéptido de la reivindicación 7 u 8; (b) proporcionar una composición que comprenda un aceite; y (c) poner en contacto el polipéptido de (a) y el aceite de (b) en condiciones donde el polipéptido pueda escindir un enlace inositol-fosfato inorgánico, realizando de este modo el desgomado del aceite.
- 25 14. Un método para producir un pienso animal o un alimento, o un complemento para piensos o alimentos, que comprende:
(i) (a) transformar una planta, una parte de la planta o una célula vegetal con el ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1-4; (b) cultivar la planta, parte de la planta o célula vegetal en condiciones en las que se exprese la enzima fitasa; y (c) convertir la planta, partes de la planta o célula vegetal en una composición adecuada para un pienso para un animal o un alimento, o un complemento para piensos o alimentos, o añadir la planta cultivada, parte de la planta o célula vegetal a un pienso animal, o a un alimento, o a un complemento para piensos o alimentos, produciendo por lo tanto un pienso animal, o un alimento, o un complemento para piensos o alimentos;
- 30 (ii) el método de (i), donde el polinucleótido está contenido en un vector de expresión y opcionalmente el vector comprende una secuencia para el control de la expresión capaz de expresar el ácido nucleico en una célula vegetal;
- 35 (iii) el método de (ii), donde el animal es un animal monogástrico y opcionalmente el animal es un rumiante;
- (iv) el método de cualquiera de los apartados (i) a (iii), donde el pienso animal o alimento, o complemento para piensos o alimentos, está en forma de una matriz de liberación, un gránulo, un comprimido, un gel, un líquido, un aerosol, un grano molido o un polvo;
- 40 (v) el método de cualquiera de los apartados (i) a (iv), donde la enzima fitasa está glucosilada o la enzima fitasa se glucosila para proporcionar termotolerancia o termoestabilidad en condiciones de granulación; o
- (vi) el método de (iv) o (v), donde la matriz de liberación se forma granulando una mezcla que comprende un germen de grano y la enzima fitasa para producir una partícula y opcionalmente los gránulos se fabrican en condiciones que comprenden la aplicación de vapor, opcionalmente los gránulos se fabrican en condiciones que comprenden la aplicación de una temperatura superior a 80 °C durante aproximadamente 5 minutos, y opcionalmente el gránulo comprende una enzima fitasa que comprende una actividad específica de al menos 350 a aproximadamente 900 unidades por miligramo de enzima.
- 45 15. Un método no terapéutico para liberar un complemento de una enzima fitasa en un animal o un ser humano, donde dicho método comprende:
(i) (a) preparar una matriz comestible de liberación que comprenda un vehículo comestible y el polipéptido de la reivindicación 7 u 8, donde la matriz dispersa y libera fácilmente la enzima fitasa cuando se pone en un medio acuoso y (b) administrar la matriz comestible de liberación enzimática al animal o ser humano;
- 55 (ii) el método de (i), donde la matriz comestible de liberación comprende un vehículo comestible granulado;
- (iii) el método de (i) o (ii), donde la matriz comestible de liberación está en forma de gránulos, comprimidos, geles, líquidos, pastas espesas, suspensiones, aerosoles o polvos, o como un implante;
- (iv) el método de (i), (ii) o (iii), donde el vehículo comestible comprende un vehículo seleccionado del grupo que consiste en germen de grano, heno, alfalfa, agróstide, cáscara de soja, harina de semilla de girasol, harina de maíz, harina de soja y harina de trigo; o
- 60 (v) el método de cualquiera de los apartados (i) a (iv), donde el vehículo comestible comprende germen de grano que se usa como aceite.
16. Un alimento, pienso, complemento para alimentos o complemento para piensos, para un animal o un ser humano: (i) que comprende el polipéptido de la reivindicación 7 u 8; (ii) el alimento, pienso, complemento para alimentos o complemento para piensos de (i), donde el polipéptido está glucosilado o la actividad fitasa es

termotolerante o termoestable; o (iii) el alimento, pienso, complemento para alimentos o complemento para piensos de (i) o (ii) elaborado en forma de gránulo, píldora, comprimido, cápsula, comprimido recubierto con película, aerosol, polvo, pasta espesa, suspensión o en forma líquida, o producido usando aditivos revestidos con polímero, o elaborado en forma granulada, o producido mediante secado por pulverización.

5 17. Una matriz de liberación enzimática comestible o que puede absorberse: (i) que comprende el polipéptido de la reivindicación 7 u 8; (ii) la matriz de liberación enzimática comestible o que puede absorberse de (i), donde el polipéptido está glucosilado y opcionalmente la actividad fitasa es termotolerante o termoestable; o (iii) la matriz de liberación enzimática comestible o que puede absorberse de (i) o (ii) que comprende, o se elabora en forma de, un gránulo, o la matriz de liberación enzimática comestible o que puede absorberse se elabora en forma de gránulo, píldora, comprimido, cápsula, comprimido recubierto con película, aerosol, polvo o forma líquida, o se produce usando aditivos revestidos con polímero, o se elabora en forma granulada, o se produce mediante secado por pulverización.

15 18. Un gránulo comestible o que puede absorberse: (i) que comprende un vehículo granulado comestible o que puede absorberse y el polipéptido de la reivindicación 7 u 8; (ii) el gránulo comestible o que puede absorberse de (i), donde el polipéptido está glucosilado y/o el polipéptido tiene una actividad fitasa que es termotolerante o termoestable; o (iii) el gránulo comestible o que puede absorberse de (i) o (ii), donde el gránulo se elabora en forma de gránulo, píldora, comprimido, cápsula, comprimido recubierto con película, aerosol, polvo o líquido, pasta espesa o suspensión, o se produce usando aditivos revestidos con polímero, o se elabora en forma granulada, o se produce mediante secado por pulverización.

20 19. Una harina de soja: (i) que comprende el polipéptido de la reivindicación 7 u 8, o (ii) la harina de soja de (i) elaborada en forma de gránulo, píldora, comprimido, cápsula, gel, comprimido recubierto con película, aerosol, polvo, pasta espesa, suspensión o forma líquida.

25

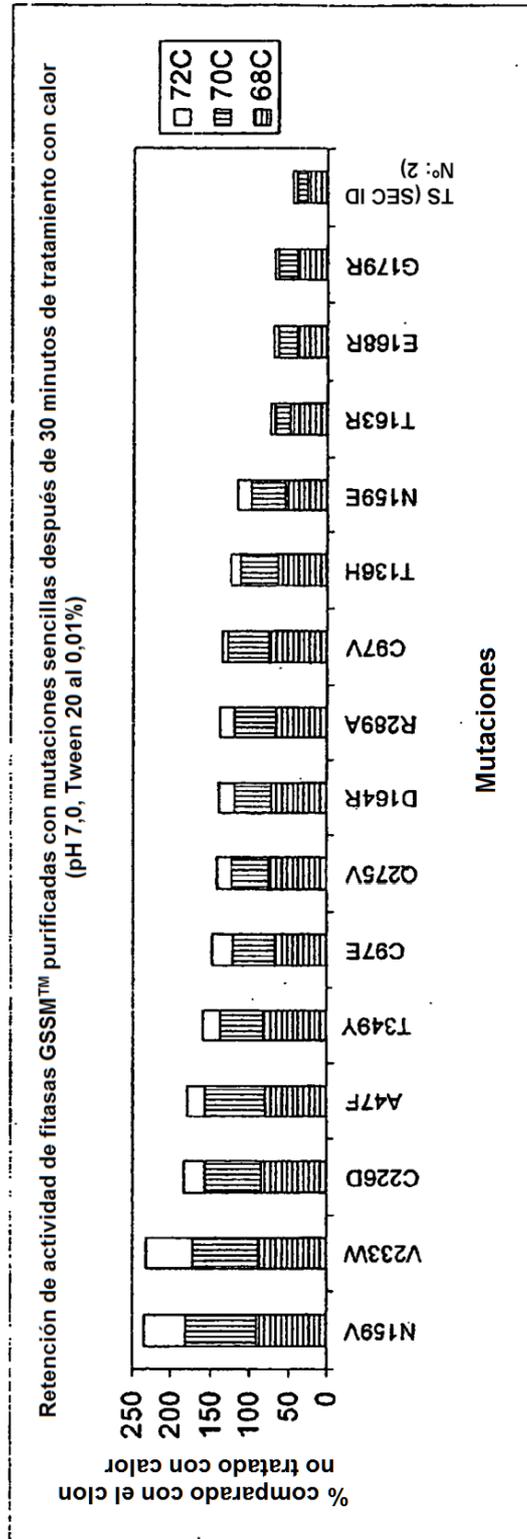


Figura 1

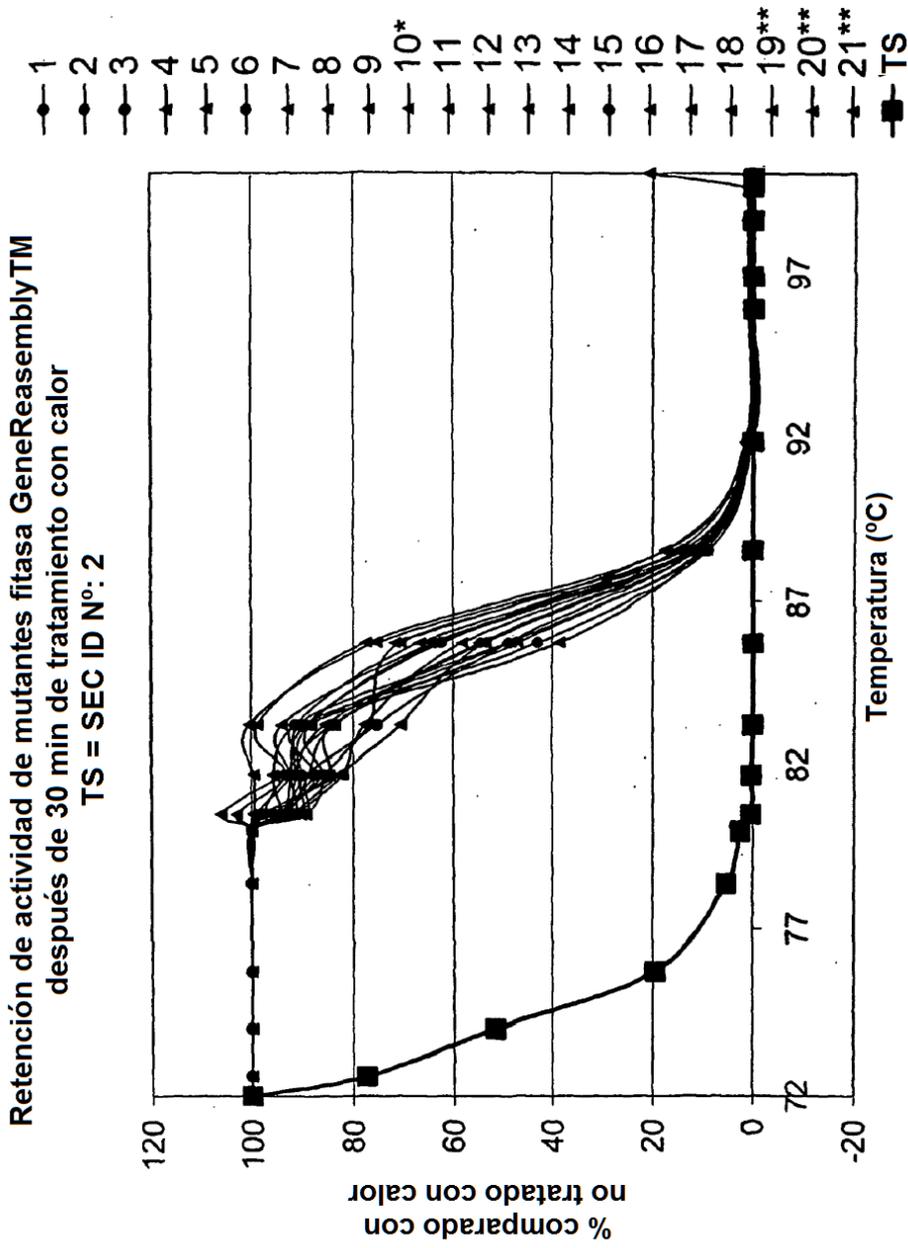


Figura 2

Fitasa Nº	Temperatura (°C)																				
	72	72,6	74	75,7	78,4	80	80,5	81,7	83,2	85,7	88,6	91,9	95,9	96,9	98,6	98,6	99,6	100			
1	100	100	100	100	100	100	94,7	90,0	90,2	42,9	9,1	0,5	0,7	0,5	0,7	0,5	0,5	0,4			
2	100	100	100	100	100	100	94,2	85,7	75,3	48,9	11,8	0,9	0,6	0,5	0,8			0,6			
3	100	100	100	100	100	100	94,5	87,3	91,5	48,8				0,3	0,3						
4	100	100	100	100	100	100	94,3	92,5	94,2	63,7	11,7	1,2	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,9			
5	100	100	100	100	100	100	90,3	90,8	88,9	63,3	12,1	1,1	1,0	0,9	0,9	0,9	0,8	1,0			
6	100	100	100	100	100	100	98,0	93,5	84,2	54,5	12,8	1,3	0,0	0,8	0,6	0,6	0,6	1,0			
7	100	100	100	100	100	100	94,6	87,3		71,7	17,6	0,7	0,2	0,2	0,1	0,3	0,2	0,2			
8	100	100	100	100	100	100	99,5	99,5	100,5	75,3	14,4	0,5	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,5			
9	100	100	100	100	100	100	91,8	82,2	77,5	58,2	12,2	1,4	1,1	1,0				1,2			
10*	100	100	100	100	100	100	94,6	95,8	91,7	66,6	11,7	0,5	0,2	0,3	0,5	0,4	0,4	0,4			
11	100	100	100	100	100	100	96,6	82,8		64,5	15,2	1,6	1,1	1,1	1,2	1,2	1,2	1,2			
12	100	100	100	100	100	100	93,2	88,8	83,6	53,8	11,5	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4			
13	100	100	100	100	100	100	92,4	82,7	70,6	53,6	11,0	0,8	0,4	0,4				20,8			
14	100	100	100	100	100	100	103,0	93,4	98,8	77,4	17,3	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1			
15	100	100	100	100	100	100	91,7	92,2	89,4	62,2	12,9		0,2	0,3	-0,2	0,2	0,2	0,2			
16	100	100	100	100	100	100	93,2	91,4	89,2	38,7	10,6	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2			
17	100	100	100	100	100	100	98,0	84,7	84,3	47,0	10,1	0,2	0,2	0,2				0,2			
18	100	100	100	100	100	100	89,2	85,8	88,2	48,5	9,4	0,7	0,8	0,4	0,5	0,4	0,4	0,2			
19**	100	100	100	100	100	100	99,2	92,1	85,5	54,4	11,0	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2			
20**	100	100	100	100	100	100	89,4	88,8	76,6	70,6	12,2	0,3	0,2		0,2	0,2	0,2	0,2			
21**	100	100	100	100	100	100	106,1	93,9		63,8	12,7	1,0	0,6	0,6	0,6	0,6	0,5	0,6			
TS (SEC ID Nº: 2)	100	77,4	51,7	19,5	5,29	2,6	0,4	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0			

Figura 3

Fitsa evolucionada nº	Nº de mutaciones	Mutaciones posibles															
		A47F	C97V	C97E	T136H	N159V	N159E	T163R	D164R	E168R	G179R	C226D	V233W	Q275V	R289A	T349Y	L363P
1	10X	A47F	C97E	C97E	T136H	N159V											
2	10X	A47F	C97E	C97E	T136H	N159V											
3	10X	A47F			T136H	N159V											
4	12X	A47F			T136H	N159V											
5	12X	A47F	C97V		T136H	N159V											
6	12X	A47F	C97V		T136H	N159V											
7	11X	A47F			T136H	N159V											
8	11X	A47F		C97E	T136H	N159V											
9	12X	A47F		C97E	T136H	N159V											
10*	12X	A47F		C97E	T136H	N159V			N159E								
11	11X	A47F	C97V		T136H	N159V											
12	13X	A47F		C97E	T136H	N159V											
13	10X	A47F		C97E	T136H	N159V											
14	12X	A47F		C97E	T136H	N159V											
15	13X	A47F	C97V		T136H	N159V			N159E								
16	10X	A47F		C97E	T136H	N159V											
17	12X	A47F		C97E	T136H	N159V											
18	11X	A47F			T136H	N159V			N159E								
19**	9X	A47F			T136H	N159V											
20**	10X	A47F	C97V		T136H	N159V											
21**	9X	A47F	C97V		T136H	N159V											
22	6X	A47F			T136H	N159V											

* Posee un (L363P) adicional no introducido por evolución GSSM™. Esta mutación se introdujo por probabilidad al azar y puede tener o no alguna importancia con la estabilidad térmica.

** Posee una etiqueta de histidina C-terminal (RSHHHHH) adicional

Figura 5

Cambio GSSM™	Aminoácido original	Aminoácido reemplazado por	Localización de mutación de codon	Posiciones nucleotídicas de codon reemplazado en la SEC ID N°: 1	Codon original	Codon reemplazado por	Todos los codones posibles del aminoácido mutado
A47F	A	F	47	139-141	GCC	TTT	TTT, TTC
C97V	C	V	97	289-291	TGT	GTT	GTT, GTC, GTA, GTG
C97E	C	E	97	289-291	TGT	GAG	GAA, GAG
T136H	T	H	136	406-408	ACC	CAT	CAT, CAC
N159V	N	V	159	475-477	AAC	GTC or GTG	GTT, GTC, GTA, GTG
N159E	N	E	159	475-477	AAC	GAG	GAA, GAG
T163R	T	R	163	487-489	ACT	CGG	CGT, CGC, CGA, CCG, AGA, AGG
D164R	D	R	164	490-492	GAC	CGG	CGT, CGC, CGA, CCG, AGA, AGG
E168R	E	R	168	502-504	GAG	CGG	CGT, CGC, CGA, CCG, AGA, AGG
G179R	G	R	179	535-537	GGG	CGG	CGT, CGC, CGA, CCG, AGA, AGG
C226D	C	D	226	676-678	TGT	GAT	GAT, GAC
V233W	V	W	233	697-699	GTA	TGG	TGG
Q275V	Q	V	275	823-825	CAA	GTG	GTT, GTC, GTA, GTG
R289A	R	A	289	865-867	CGC	GCT	GCT, GCC, GCA, GCG
T349Y	T	Y	349	1045-1047	ACG	TAT	TAT, TAC
L363P	L	P	363	1087-1089	CTA	CCA	CCA, CCC, CCG, CCT

Figura 6

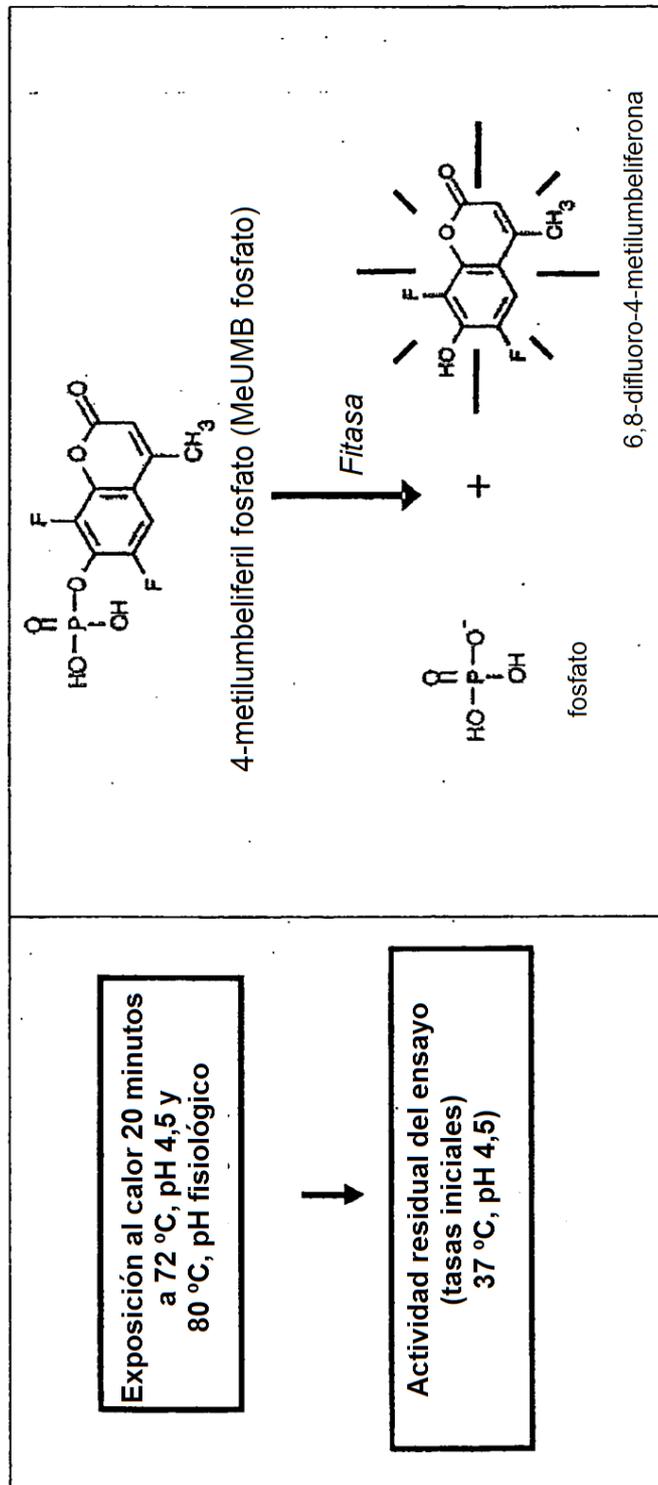


Figura 7

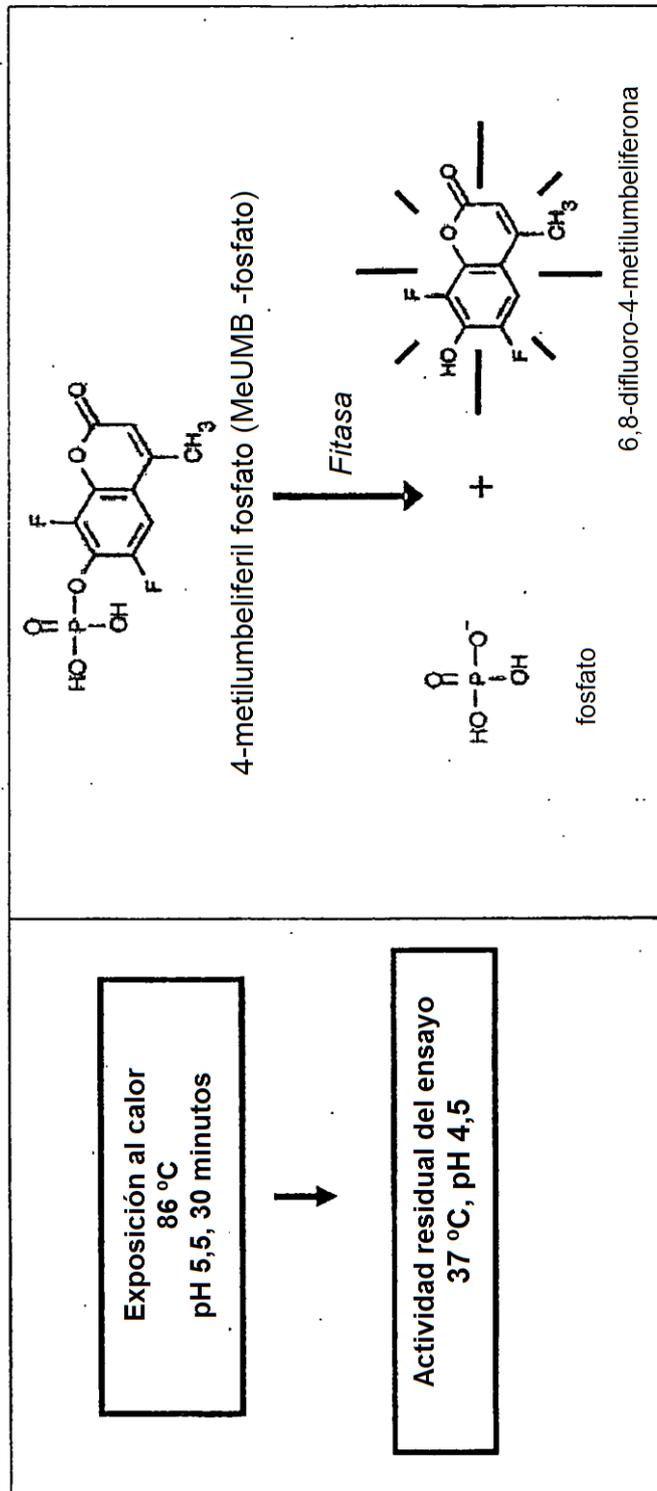


Figura 8

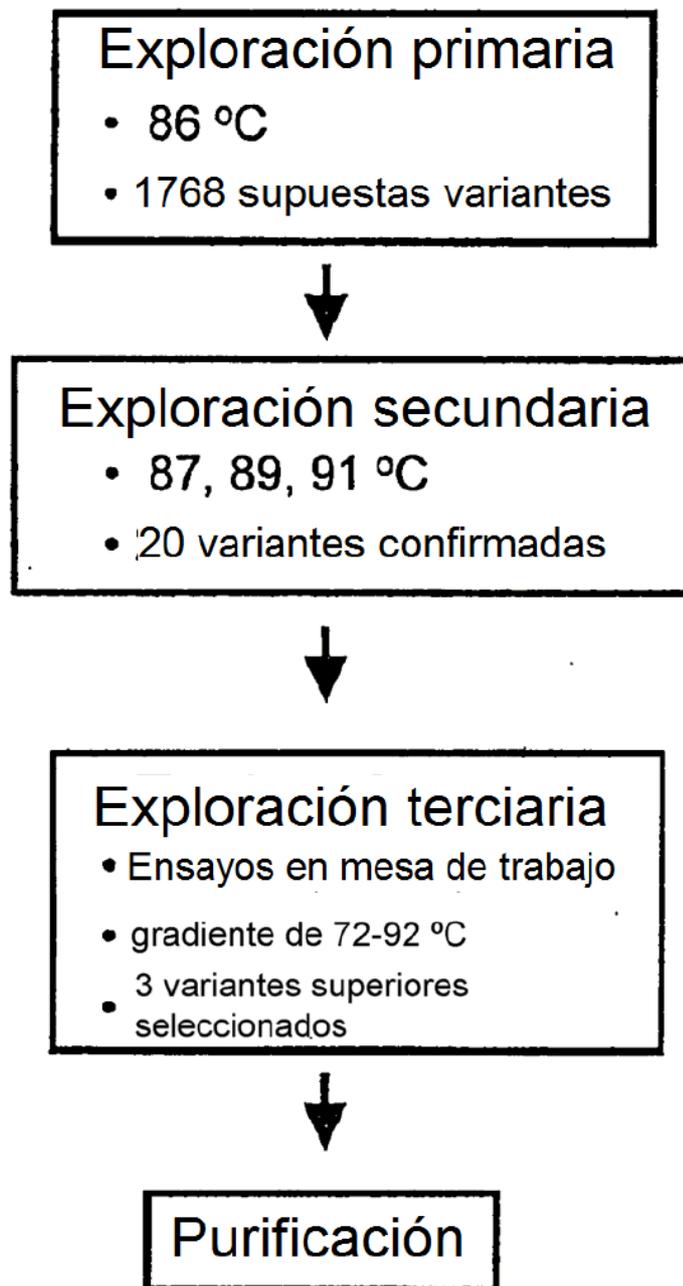


Figura 9

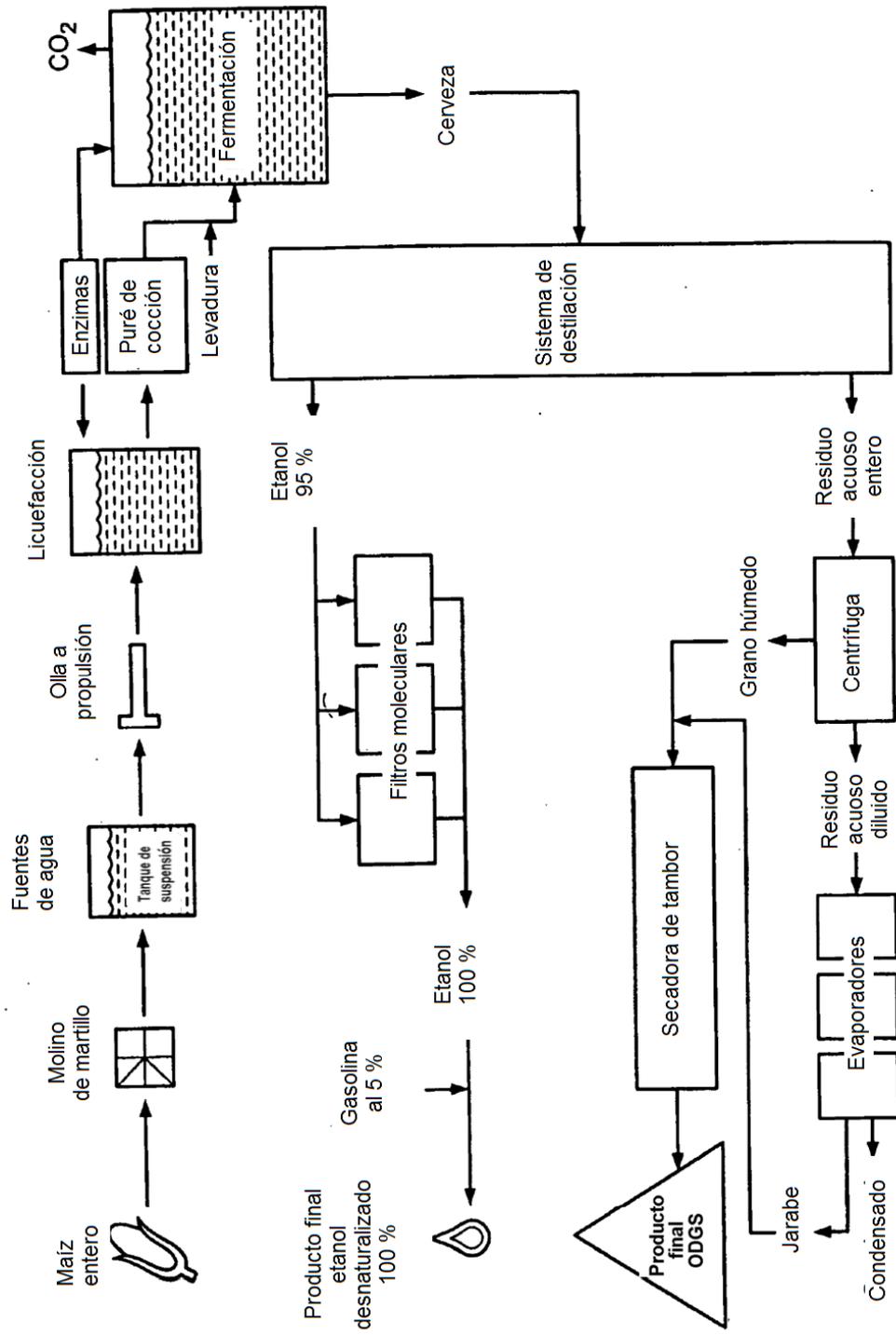


Figura 10

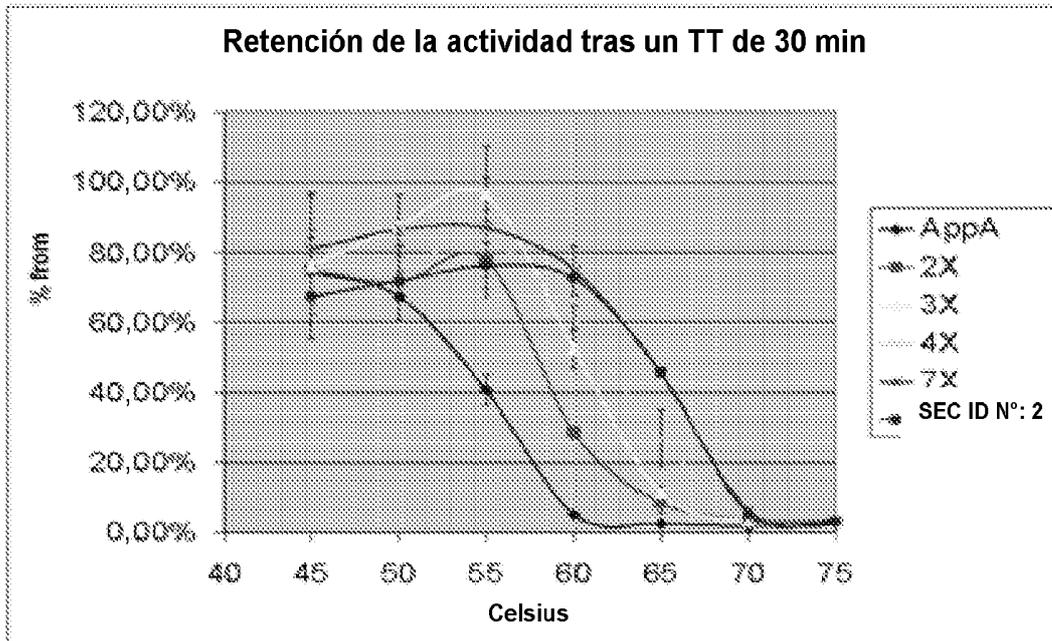


Fig. 11A

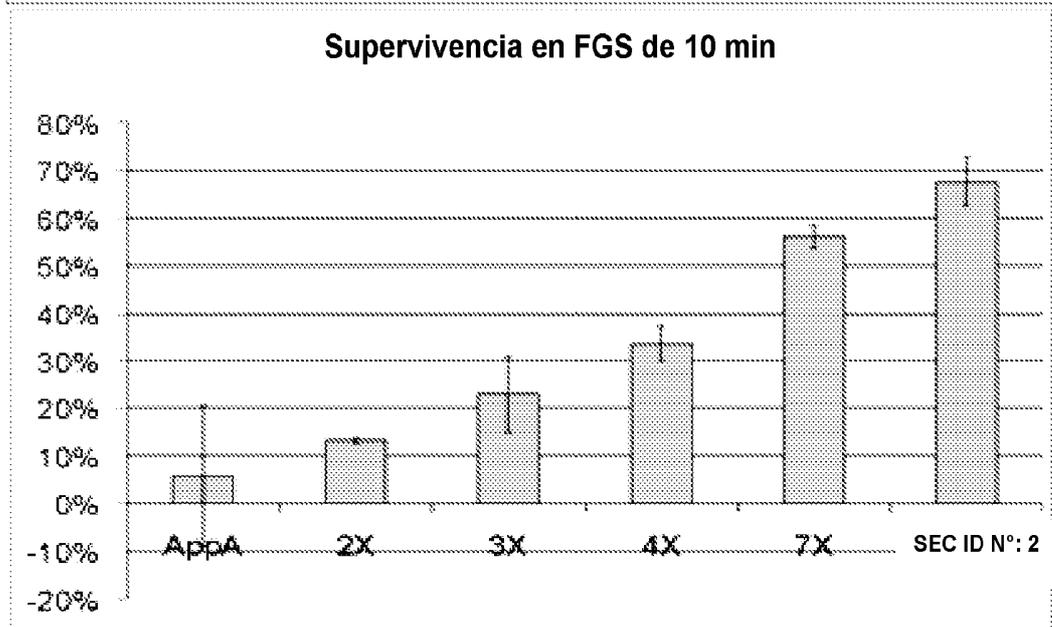


Fig. 11B

Figuras 11A y 11B

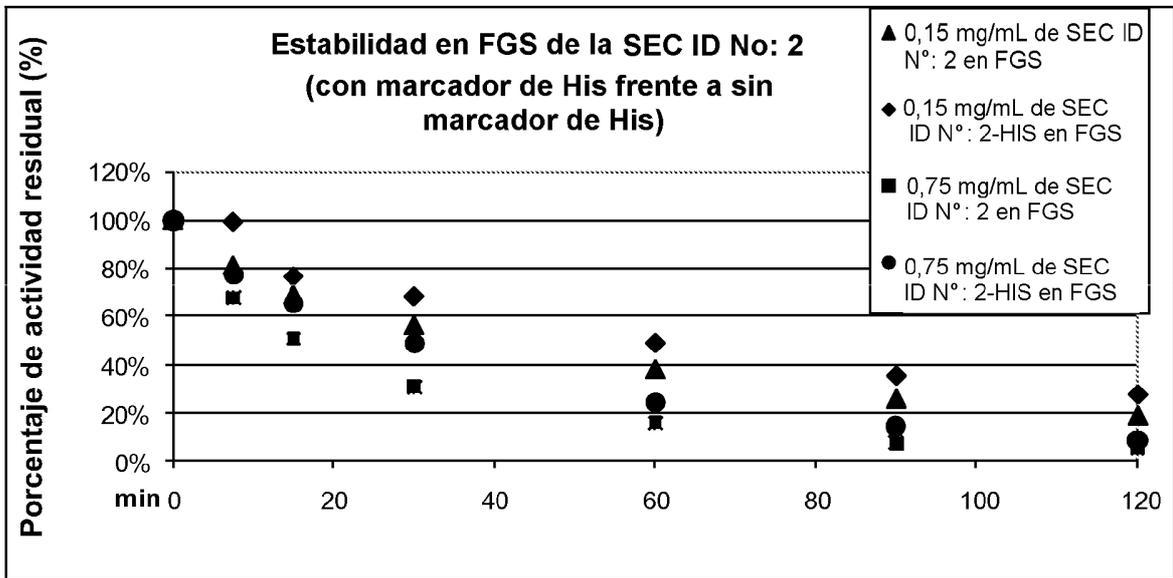


Figura 12

Tratamiento térmico a 80C de variantes de fitasa (expresadas en *Pichia pastoris*)

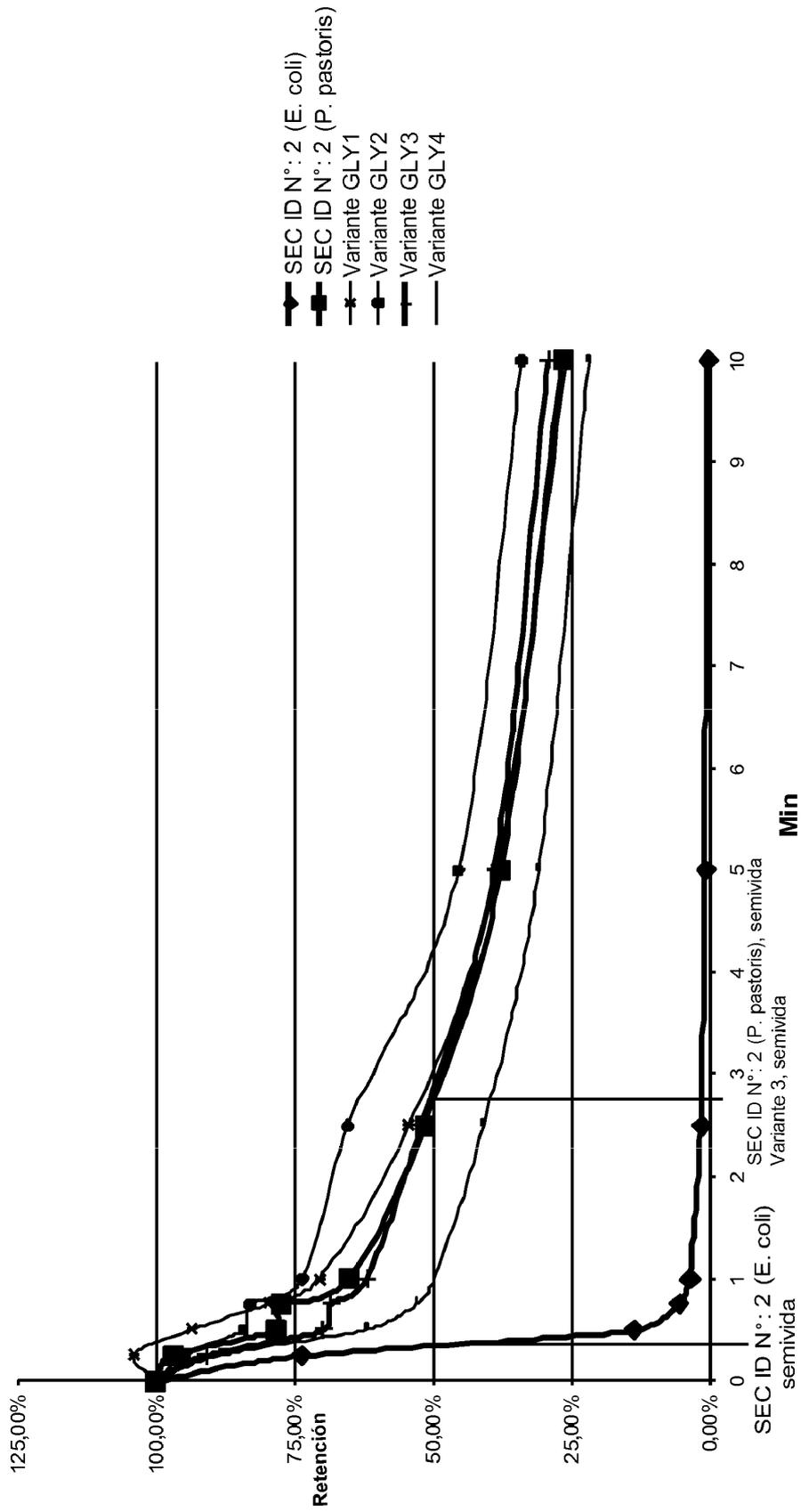


Figura 13

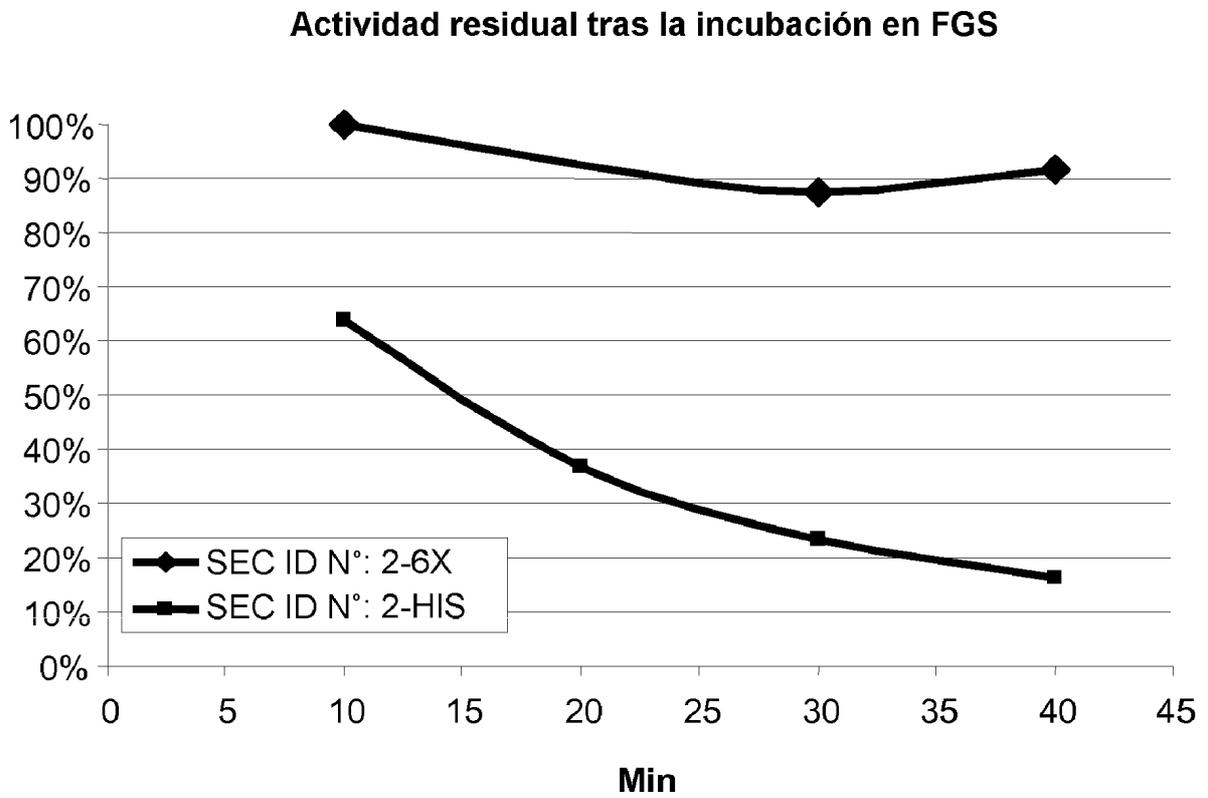


Figura 14

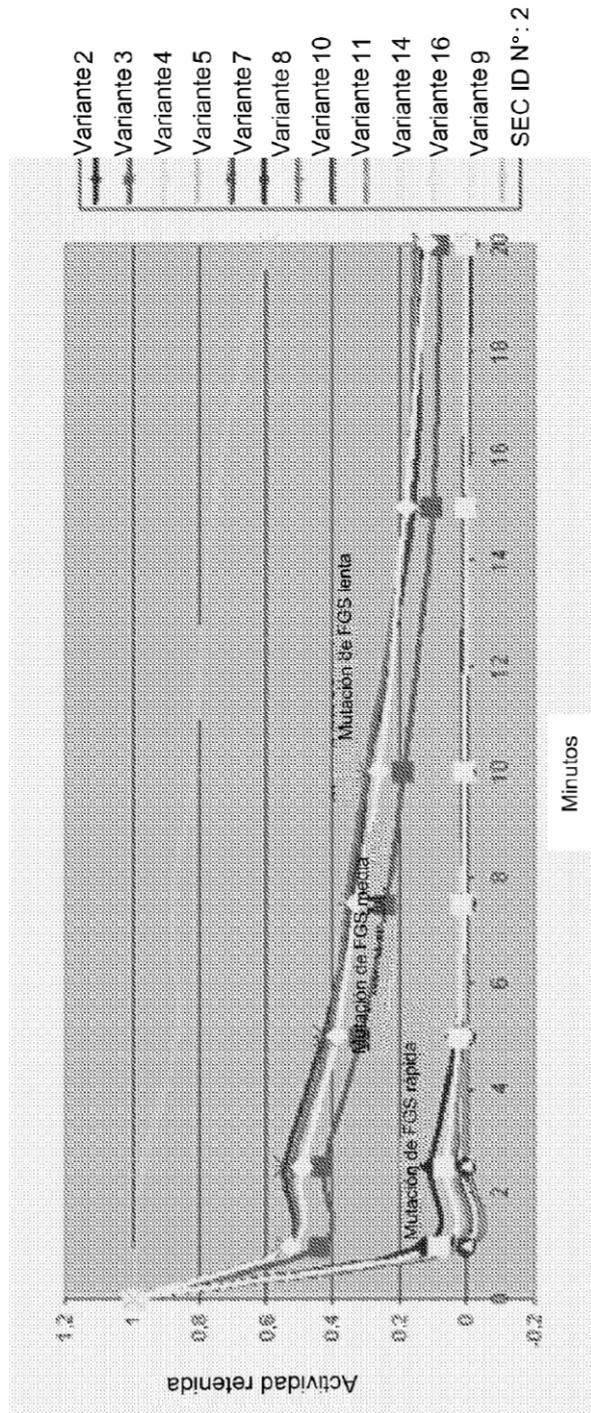


Figura 15

Efectos de los aminoácidos sobre las propiedades de FGS

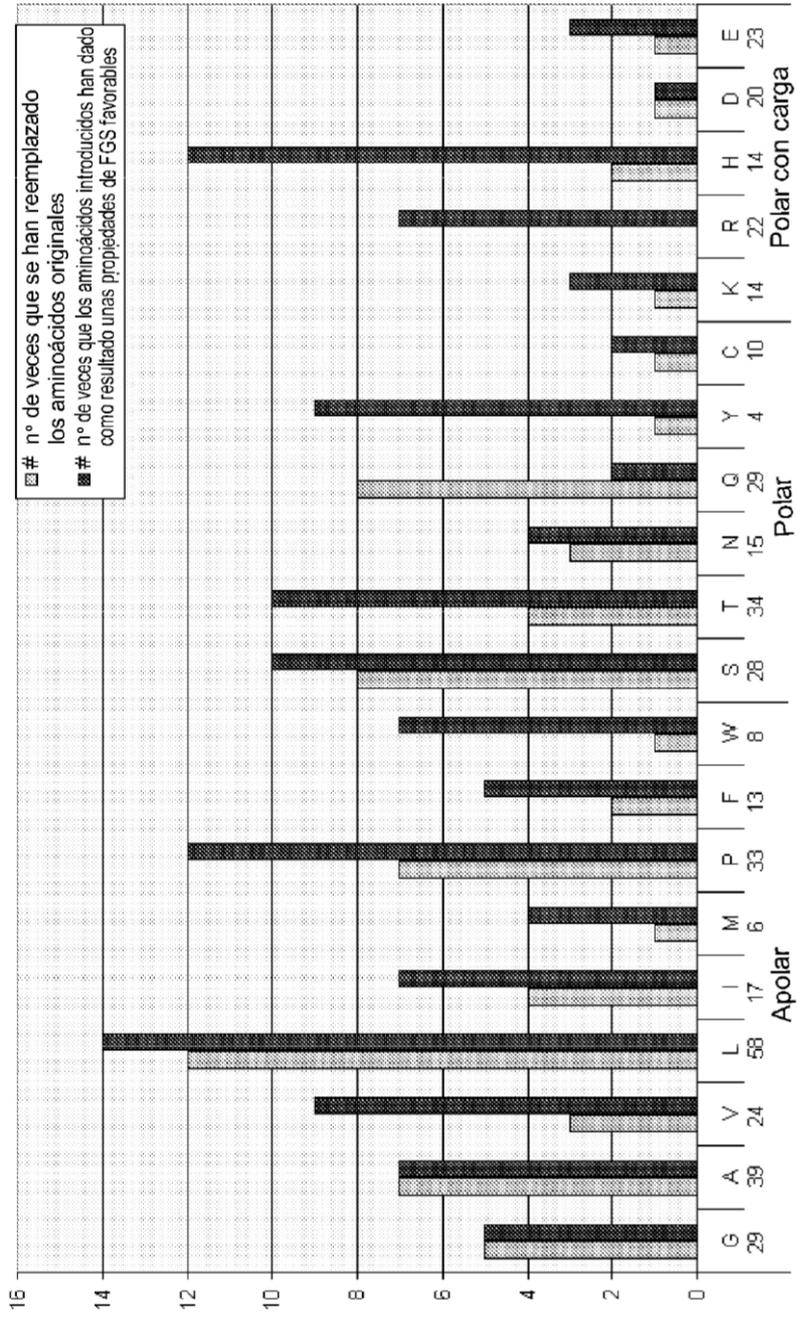


Figura 16

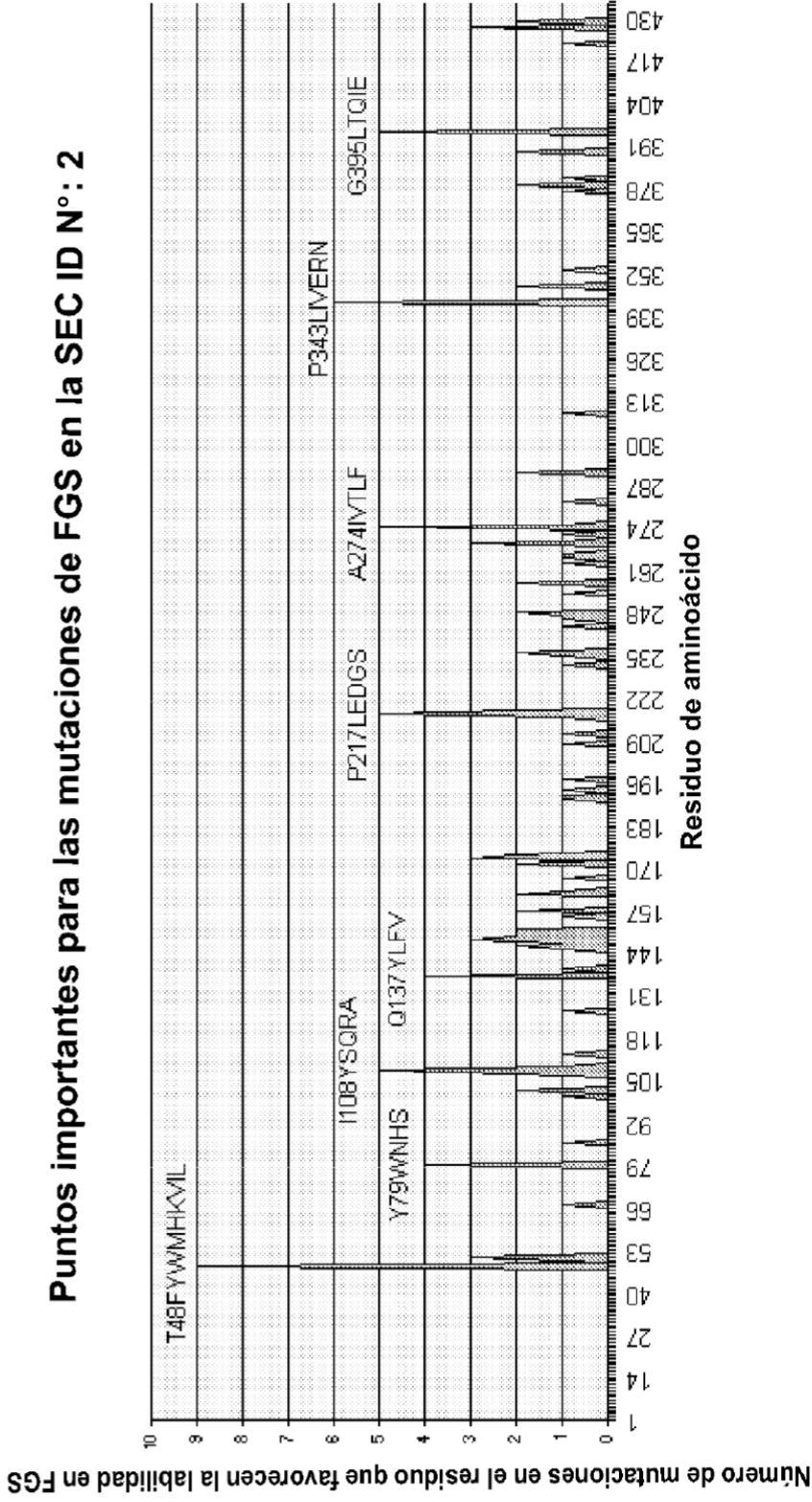


Figura 17

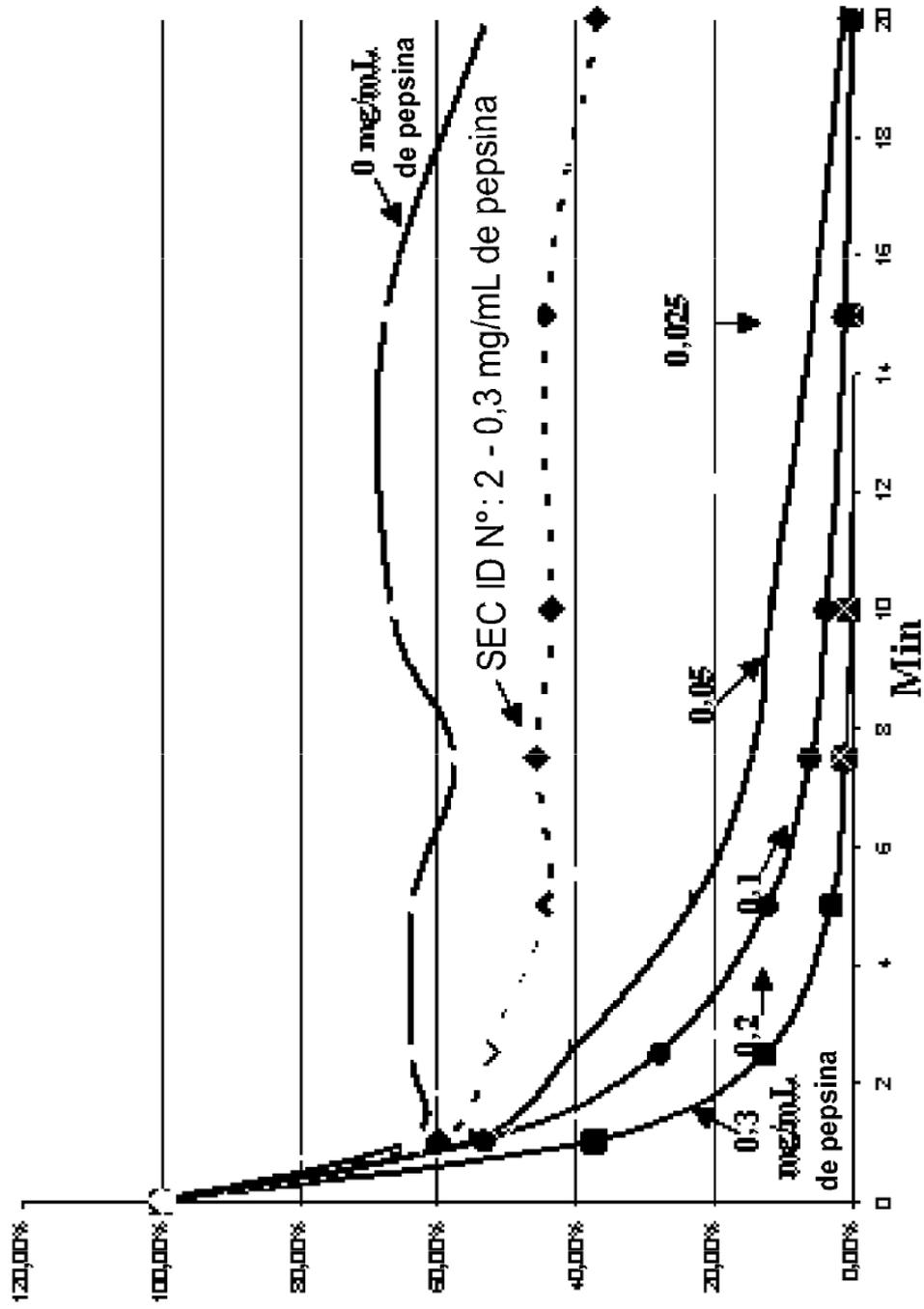


Figura 18

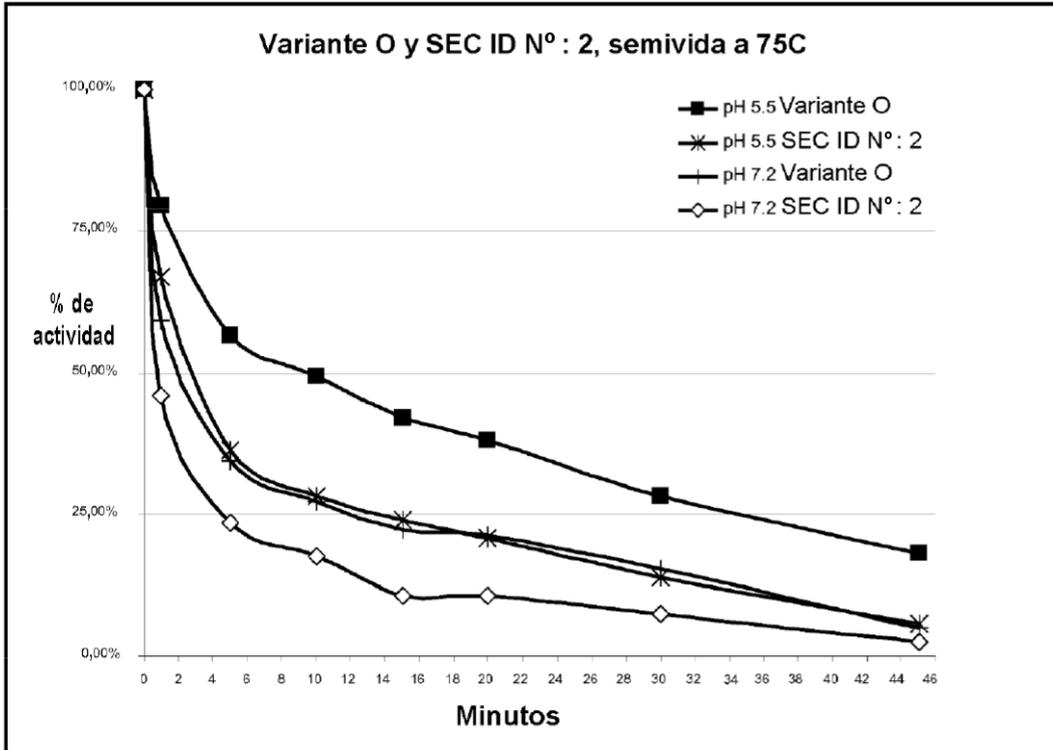


Figura 19

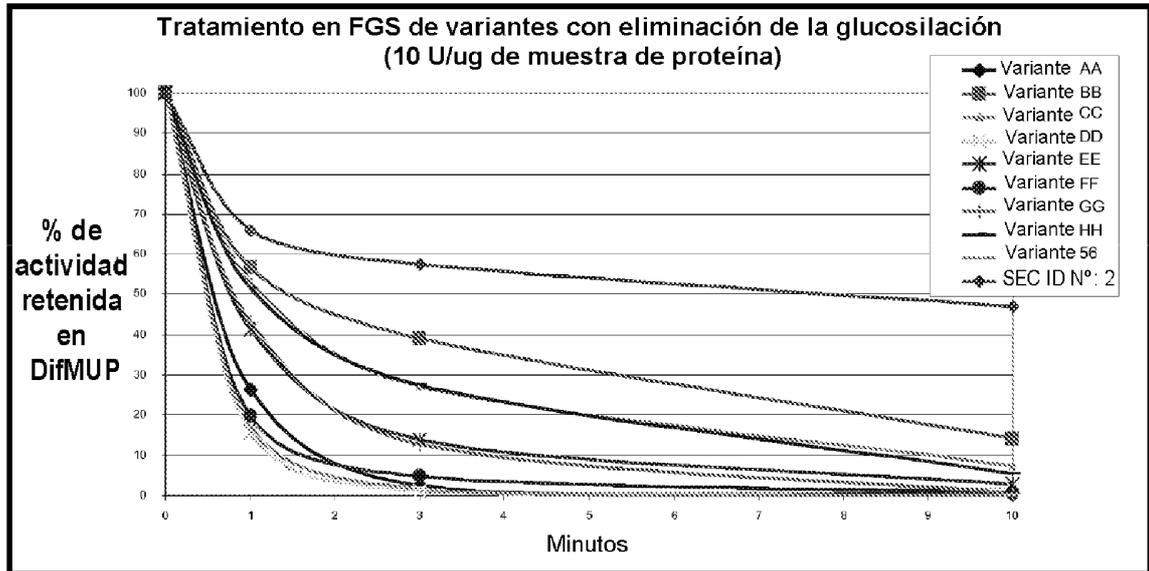


Figura 20

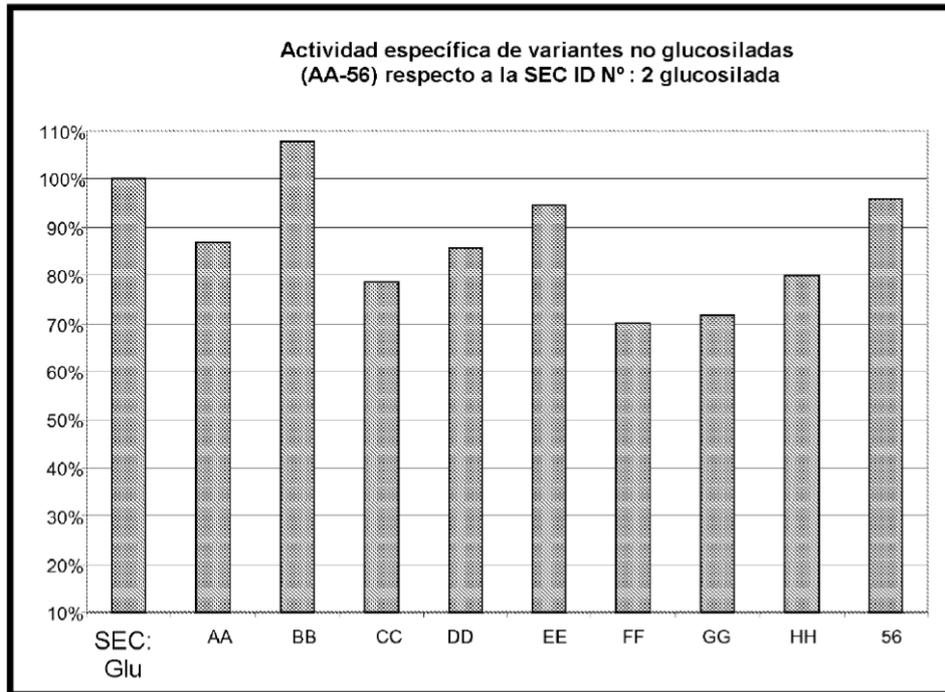


Figura 21