

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 039**

51 Int. Cl.:

C12N 9/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.08.2012 PCT/EP2012/066099**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.02.2013 WO13026796**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2012 E 12748458 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.07.2017 EP 2744900**

54 Título: **Polipéptidos con actividad de proteasa**

30 Prioridad:

19.08.2011 EP 11178201

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

07.11.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SJOEHOLM, CARSTEN;
OESTERGAARD, PETER RAHBEK;
HOFF, TINE;
PONTOPPIDAN, KATRINE y
OLINSKI, ROBERT PIOTR**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 641 039 T3

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

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos con actividad de proteasa

5 **Referencia a un listado de secuencias**

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

10 **Antecedentes de la invención**

Campo de la invención

15 [0002] La presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen actividad de proteasa y secuencias de ácidos nucleicos aisladas que codifican las proteasas. La invención también se refiere a constructos de ácidos nucleicos, vectores, y células huésped, incluidas células vegetales y animales, que comprenden las secuencias de ácidos nucleicos, al igual que a métodos para producir y utilizar las proteasas, en particular al uso de las proteasas en el pienso para animales, y detergentes.

20 **Antecedentes de la invención**

25 [0003] En el uso de proteasas en el pienso para animales (*in vivo*), y/o el uso de tales proteasas para tratar proteínas vegetales (*in vitro*) cabe señalar que las proteínas son factores nutricionales esenciales para animales y seres humanos. Muchos seres humanos y ganado obtienen las proteínas necesarias de fuentes de proteínas vegetales. Fuentes de proteínas vegetales importantes son por ejemplo cultivos oleaginosos, legumbres y cereales.

30 [0004] Cuando por ejemplo se incluye harina de soja en el pienso de animales monogástricos tales como cerdos y aves, una proporción significativa de los sólidos de harina de soja no es digerida de manera eficaz (la digestibilidad de proteína ileal aparente en lechones, cerdos en crecimiento y aves tales como pollos tipo broiler, gallinas ponedoras y gallos es solo alrededor de 80%).

35 [0005] El tracto gastrointestinal de animales consiste en una serie de segmentos cada uno representando entornos de pH diferentes. En animales monogástricos tales como cerdos y aves y muchos peces el estómago muestra fuertemente pH ácido tan bajo como pH 1-2, mientras que el intestino muestra un pH más neutro en el área de pH 6-7. Las aves además del estómago e intestino también tienen un cultivo que precede al estómago, el pH en el cultivo se determina en su mayoría por el pienso ingerido y por lo tanto típicamente se encuentra en el rango de pH de 4-6. La digestión de proteínas por una proteasa puede ocurrir a lo largo del tracto digestivo entero, suponiendo que la proteasa es activa y sobrevive a las condiciones en el tracto digestivo. Por lo tanto, las proteasas que son altamente estables en ácido para la supervivencia en el ambiente gástrico y al mismo tiempo son eficazmente activas a pH fisiológico amplio del animal objetivo son especialmente deseables.

45 [0006] También, el pienso para animales es frecuentemente formulado en la forma granulada, donde se aplica vapor en el proceso de granulación. Es por lo tanto deseable también que las proteasas usadas en pienso para animales sean capaces de permanecer activas después de la exposición al tratamiento con vapor.

Polipéptidos con actividad de proteasa

50 [0007] Los polipéptidos con actividad de proteasa, o proteasas, son a veces llamadas también peptidasas, proteinasas, péptido hidrolasas, o enzimas proteolíticas. Las proteasas pueden ser del tipo exo que hidrolizan péptidos que comienzan en cada final de las mismas, o del endotipo que actúa internamente en las cadenas del polipéptido (endopeptidasas). Las endopeptidasas muestran actividad en sustratos de péptidos bloqueados N- y C-terminalmente que son pertinentes para la especificidad de la proteasa en cuestión.

55 [0008] El término "proteasa" es definido aquí como una enzima que hidroliza enlaces de péptidos. Esta definición de proteasa también se aplica a la parte de proteasa de los términos "proteasa progenitora" y "variante de proteasa," como se utiliza aquí. El término "proteasa" incluye cualquier enzima del grupo enzimático EC 3.4 (incluidas cada una de las trece subclases del mismo). El número EC se refiere a la nomenclatura enzimática de 1992 de NC-IUBMB, Academic Press, San Diego, California, incluidos los suplementos 1-5 publicados en Eur. J. Biochem. 1994, 223,1-5; Eur. J. Biochem. 1995, 232,1-6; Eur. J. Biochem. 1996, 237,1-5; Eur. J. Biochem. 1997, 250,1-6; y Eur. J. Biochem. 1999, 264,610-650; respectivamente. La nomenclatura se suplementa y actualiza regularmente; véase por ejemplo World Wide Web (WWW) en <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/index.html>.

65

[0009] Las proteasas de la invención y para uso según la invención son seleccionadas del grupo que consiste en:

(a) proteasas del grupo enzimático EC 3.4.21.; y/o

(b) serina proteasas de la familia de peptidasa S1, o más específicamente S1A;

como se describe en Biochem.J. 290:205-218 (1993) y en la base de datos de proteasas MEROPS, publicación 9.4 (31 enero 2011) (www.merops.ac.uk). La base de datos es descrita en Rawlings, N.D., Barrett, A.J. & Bateman, A. (2010) MEROPS: the peptidase database. Nucleic Acids Res 38, D227-D233..

[0010] Más específicamente las proteasas de la invención son aquellas que prefieren un residuo de aa aromático hidrofóbico en la posición P1.

[0011] Para la determinación de si una proteasa dada es una serina proteasa, y una proteasa de la familia S1A, se hace referencia al manual anterior y los principios indicados en el mismo. Tal determinación puede llevarse a cabo para todos los tipos de proteasas, sea proteasas de origen natural o de tipo salvaje; o proteasas genéticamente modificadas o sintéticas.

[0012] Las peptidasas de familia S1 contienen la tríada catalítica His, Asp y Ser en este orden. La mutación de cualquiera de los aminoácidos de la tríada catalítica dará lugar a la pérdida de actividad enzimática. Los aminoácidos de la tríada catalítica de la proteasa 1 de S1 de *Kribbella solani* (SEQ ID N.º: 2) y *Kribbella aluminosa* (SEQ ID N.º: 4) son probablemente las posiciones His-138; Asp-168 y Ser-250.

[0013] La actividad de proteasa se puede medir utilizando cualquier ensayo, donde un sustrato es empleado, que incluye enlaces de péptidos pertinentes para la especificidad de la proteasa en cuestión. El pH de ensayo y temperatura de ensayo deben asimismo ser adaptados a la proteasa en cuestión. Los ejemplos de valores de pH de ensayo son pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12. Ejemplos de temperatura de ensayo son 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 90, o 95°C. Ejemplos de sustratos de proteasa son caseína, tal como caseína reticulada con azurina (caseína AZCL), o suc-AAPF-pNA,. Ejemplos de ensayos de proteasa adecuados son descritos en la parte experimental.

Descripción de las técnicas relacionadas

[0014] Proteasas aisladas de *Kribbella*, y *Streptomyces* se conocen en la técnica. Una proteasa de *Kribbella flavida* se describe en Lucas,S. et al. "The complete genome of *Kribbella flavida* DSM 17836."; remitido (SEP-2009) a las bases de datos EMBL/GenBank/DDBJ (SWISSPROT: C1WJ16 SEQ ID NO:6 aquí). La secuencia tiene 80,23% de identidad a la secuencia de SEQ ID NO:2 y 80,81% de identidad a la secuencia de SEQ ID NO:4 para la proteasa madura. La secuencia de DNA de la referencia (SEQ ID NO:5 aquí) tiene una identidad de 81,6% a la secuencia de la secuencia SEQ ID NO:1 y 85,51% de identidad a la secuencia SEQ ID NO:3, aquí.

[0015] El documento WO 2004/033668 divulga una proteasa de bacterias, con el número de registro GeneSeq ADM99133, que tiene una identidad del 56,1% a la secuencia de SEQ ID NO:2 y una identidad del 55,9% a la secuencia de SEQ ID N.º: 4. La secuencia de DNA correspondiente tiene una identidad de 66,3% a la secuencia de SEQ ID NO:1 y una identidad del 65,9% a la secuencia de SEQ ID NO:3. Este documento también divulga composiciones detergentes y aditivos para piensos y alimentos que contienen dicha proteasa al igual que el tratamiento de alimentos usando dicha proteasa.

[0016] Una proteasa, Streptogrisina B, se describe en Henderson, G. Krygsman, P. Liu,C.J. Davey,C.C. Malek, L.T.; "Characterization and structure of genes for proteases A and B from *Streptomyces griseus*."; J. Bacteriol. 169:3778-3784 (1987). Identidades de secuencia para esta proteasa son inferiores a aquellas indicadas arriba:

[0017] La presente invención proporciona polipéptidos con actividad de proteasa y polinucleótidos que codifican los polipéptidos. Las proteasas de la invención son serina proteasas de la familia de peptidasa S1A. Las proteasas de la invención presentan propiedades de pH sorprendentes, especialmente estabilidad de pH y propiedades de actividad de pH que las convierten en candidatos interesantes para usar en el pienso para animales. Las proteasas de la invención por lo tanto son activas en Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA dentro de una gama amplia de pH 4-11 y presentan actividad especialmente alta en el rango de pH de 6-11, son activas en un sustrato de harina de maíz-harina de soja relevante en el pienso dentro de un amplio rango de pH fisiológico de pH 3-7 y retiene más del 80% de actividad después de ser sometido durante 2 horas a un pH tan bajo como 2.

[0018] El uso de proteasas en el pienso para animales para mejorar la digestión de proteínas en el pienso es conocido. WO 95/28850 divulga la combinación de una fitasa y una o más enzimas proteolíticas microbianas para mejorar la solubilidad de proteínas vegetales. WO 01/58275 divulga el uso de proteasas estables en ácido de la familia de subtilisina en el pienso para animales. WO 01/58276 divulga el uso en el pienso para animales de proteasas estables en ácido relacionadas con la proteasa derivada de *Nocardioopsis* sp. NRRL

18262 (la proteasa 10R), al igual que una proteasa derivada de *Nocardiosis alba* DSM 14010. WO 04/072221, WO 04/111220, WO 04/111223, WO 05/035747, y WO 05/123911 divulgan proteasas relacionadas con la proteasa 10R y su uso en el pienso para animales. También, WO 04/072279 divulga el uso de otras proteasas.

5

[0019] WO 04/034776 divulga el uso de una subtilisina/queratinasa, PWD-1 de *B. Licheniformis* en el pienso de aves. WO 04/077960 divulga un método para aumentar la digestibilidad de forraje o grano en ruminantes aplicando una proteasa bacteriana o fúngica.

10

[0020] Productos comerciales que comprenden una proteasa y comercializados para usar en el pienso para animales incluyen RONOZYME® ProAct (DSM NP/Novozymes) Axtra® (Danisco), Avizyme® (Danisco), Porzyme® (Danisco), Allzyme™ (Alltech), Versazyme® (BioResources; Int.), Poultrygrow™ (Jefo) y Cibenza® DP100 (Novus).

15

Resumen de la invención

[0021] La presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen actividad de proteasa seleccionada del grupo que consiste en:

20

- (a) un polipéptido con al menos 85% identidad de secuencia al polipéptido maduro de SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4;
- (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos 86% de identidad de secuencia a la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 1 o SEQ ID NO:3;
- (c) un fragmento de un polipéptido de (a) o (b), que tiene actividad de proteasa.

25

[0022] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican los polipéptidos de la presente invención, constructos de ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, y células huésped recombinantes que comprenden los polinucleótidos, y a métodos para producir los polipéptidos.

30

[0023] La presente invención también se refiere a métodos para la preparación de una composición para usar en el pienso para animales, para mejorar el valor nutricional de un pienso para animales, y métodos de tratamiento de proteínas para usarse en las composiciones de pienso para animales.

35

[0024] Además la presente invención también se refiere a al uso de las proteasas en composiciones detergentes y tales composiciones detergentes.

Visión general del listado de secuencias

40

- [0025]
- SEQ ID NO:1 es la secuencia de DNA como se aísla de *Kribbella solani*.
- SEQ ID NO:2 es la secuencia de aminoácidos como se deduce de SEQ ID NO:1
- SEQ ID NO:3 es la secuencia de DNA como se aísla de la *Kribbella aluminosa*.
- SEQ ID NO:4 es la secuencia de aminoácidos como se deduce de SEQ ID NO:3 SEQ ID NO:5 es la secuencia de DNA de *Kribbella flavida* (EMBL:CP001736)
- SEQ ID NO:6 es la secuencia de aminoácidos de *Kribbella flavida* (Lucas,S. Et al. "The complete genome of *Kribbella flavida* DSM 17836." UNIPROT:D2Q1F6)
- SEQ ID NO:7 es la secuencia de DNA de la proteasa 10R (WO 05/035747, SEQ ID NO:1)
- SEQ ID NO:8 es la secuencia de aminoácidos de la proteasa 10R (WO 05/035747, SEQ ID NO:2)
- SEQ ID NO:9 es el cebador directo específico de peptidasa de *Kribbella solani* S1.
- SEQ ID NO:10 es el cebador inverso específico de peptidasa de *Kribbella solani* S1.
- SEQ ID NO:11 es el cebador directo específico de peptidasa de *Kribbella aluminosa* S1.
- SEQ ID NO:12 es el cebador inverso específico de peptidasa de *Kribbella aluminosa* S1.
- SEQ ID NO:13 es el cebador directo específico del fragmento flanqueante corriente arriba.
- SEQ ID NO:14 es el cebador inverso específico del fragmento flanqueante corriente arriba.
- SEQ ID NO:15 es el cebador directo específico del fragmento flanqueante corriente abajo.
- SEQ ID NO:16 es el cebador inverso específico del fragmento flanqueante corriente abajo.
- SEQ ID:17 es una señal de secreción de *Bacillus lentus*.

Matriz de identidad de secuencias:

Proteína	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:6 <i>Kribbella flavida</i>	SEQ ID NO:8 proteasa 10R
SEQ ID NO:2	100	95	80.23	46.41
SEQ ID NO:4		100	80.81	47.51
SEQ ID NO:6			100	60.23
SEQ ID NO:8				100
DNA	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:7

			Kribbella flavida	proteasa 10R
SEQ ID NO:1	100	90.76	81.82	70.96
SEQ ID NO:3	90.76	100	85.51	72.92
SEQ ID NO:5			100	72.68
SEQ ID NO:7				100

Definiciones

[0026]

5 **Actividad de proteasa:** el término "actividad de proteasa" significa una actividad proteolítica (EC 3.4). Las proteasas de la invención son endopeptidasas (EC 3.4.21). Hay diferentes tipos de actividad de proteasa: los tres tipos de actividad principal son: de tipo tripsina donde hay escisión de sustratos de amida después de Arg o Lys en P1, tipo quimiotripsina donde ocurre la escisión después de que uno de los aminoácidos hidrofóbicos en P1, y tipo elastasa con escisión después de un Ala en P1. Para fines de la presente invención, la actividad de proteasa se determina según el procedimiento descrito en "Materiales y Métodos" a continuación.

Los polipéptidos de la presente invención tienen al menos 20%, por ejemplo, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, y al menos 100% de la actividad de proteasa del polipéptido maduro de SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4.

15 **Aislado:** el término "aislado" significa una sustancia en una forma o ambiente que no se origina en la naturaleza. Ejemplos no limitativos de sustancias aisladas incluyen (1) cualquier sustancia que no ocurra de forma natural, (2) cualquier sustancia que incluye, pero no se limita a, cualquier enzima, variante, ácido nucleico, proteína, péptido o cofactor, que es al menos parcialmente quitado de uno o más o todos los constituyentes de origen natural con los cuales se asocia en la naturaleza; (3) cualquier sustancia modificada por la mano humana con respecto a la sustancia encontrada en la naturaleza; o (4) cualquier sustancia modificada mediante el aumento de la cantidad de la sustancia con respecto a otros componentes con los cuales se asocia naturalmente (por ejemplo, copias múltiples de un gen que codifica la sustancia; uso de un promotor más fuerte que el promotor naturalmente asociado al gen que codifica la sustancia). Una sustancia aislada puede estar presente en una muestra de caldo de fermentación.

20 Un "polipéptido aislado" es al menos 1% puro, por ejemplo, al menos 5% puro, al menos 10% puro, al menos 20% puro, al menos 40% puro, al menos 60% puro, al menos 80% puro, y al menos 90% puro, como se determina por SDS-PAGE.

25 **Polipéptido sustancialmente puro:** el término "polipéptido sustancialmente puro" significa una preparación que contiene como mucho 10%, como mucho 8%, como mucho 6%, como mucho 5%, como mucho 4%, como mucho 3%, como mucho 2%, como mucho 1%, y como mucho 0,5% en peso de otro material de polipéptido con el cual se asocia de forma original o recombinante. Preferiblemente, el polipéptido es al menos 92% puro, por ejemplo, al menos 94% puro, al menos 95% puro, al menos 96% puro, al menos 97% puro, al menos 98% puro, al menos 99%, al menos 99,5% puro, y 100% en peso puro del material de polipéptido total presente en la preparación. Los polipéptidos de la presente invención están preferiblemente en una forma sustancialmente pura. Esto puede ser realizado, por ejemplo, preparando el polipéptido por métodos recombinantes bien conocidos o por métodos de purificación tradicionales.

30 **Polipéptido maduro:** el término "polipéptido maduro" significa un polipéptido en su forma final después de la traducción y cualquier modificación postraduccional, tal como tratamiento N-terminal, truncamiento C-terminal, glicosilación, fosforilación, etc. En un aspecto, el polipéptido maduro es aminoácidos 1 a 188 en la numeración de SEQ ID N.º: 2, aminoácidos -105 a -75 en la numeración de SEQ ID N.º: 2 es un péptido señal. En otro aspecto, el polipéptido maduro es aminoácidos 1 a 189 en la numeración de SEQ ID N.º: 4, aminoácidos -105 a -75 en la numeración de SEQ ID N.º: 4 es un péptido señal.

35 **Secuencia codificante del polipéptido maduro:** el término "secuencia codificante del polipéptido maduro" significa un polinucleótido que codifica un polipéptido maduro que tiene actividad de proteasa. En un aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos 316 a 879 en la numeración de SEQ ID N.º: 1. Otros nucleótidos 1 a 90 en la numeración de SEQ ID N.º: 1 codifican un péptido señal. En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos 316 a 882 en la numeración de SEQ ID N.º: 1. Otros nucleótidos 1 a 90 en la numeración de SEQ ID N.º: 1 codifican un péptido señal.

40 **Identidad de secuencias:** la relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos es descrita por el parámetro "identidad de secuencias". Para fines de la presente invención, el grado de identidad de secuencias entre dos secuencias de aminoácidos es determinado utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) como se implementa en el programa de Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferiblemente versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros opcionales usados son penalización por apertura de gap de 10, penalización por extensión de gap de 0.5, y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión de EMBOSS de BLOSUM62). El resultado de Needle etiquetado "identidad más larga" (obtenido utilizando la opción -nobrief) se usa como el porcentaje de identidad y se calcula de la siguiente manera:

60
$$\frac{\text{Residuos idénticos} \times 100}{\text{Longitud de alineamiento} - \text{Número total de Gaps en alineamiento}}$$

Para fines de la presente invención, el grado de identidad de secuencias entre dos secuencias desoxirribonucleótidas es determinado utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, supra) como se implementa en el programa de Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, supra), preferiblemente versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros opcionales usados son penalización por apertura de espacio de 10, penalización por extensión de espacio de 0.5, y la matriz de sustitución EDNAFULL (versión de EMBOSS de NCBI NUC4.4). El resultado de Needle etiquetado "identidad más larga" (obtenido utilizando la opción -nobrief) se usa como el porcentaje de identidad y se calcula de la siguiente manera:

10 $(\text{Desoxirribonucleótidos idénticos} \times 100) / (\text{Longitud de alineamiento} - \text{Número total de Gaps en alineamiento})$

Fragmento: el término "fragmento" significa un polipéptido con uno o más (diferentes) aminoácidos eliminados del término amino y/o carboxilo de un polipéptido maduro; donde el fragmento tiene actividad de proteasa. En un aspecto, un fragmento contiene al menos 168 residuos de aminoácidos (por ejemplo, aminoácidos 11 a 178 de SEQ ID N.º: 2), al menos 178 residuos de aminoácidos (por ejemplo, aminoácidos 6 a 183 de SEQ ID N.º: 2) o correspondientemente para SEQ ID NO:4 un fragmento contiene al menos 169 residuos de aminoácidos (por ejemplo, aminoácidos 11 a 179 de SEQ ID N.º: 4) o al menos 180 residuos de aminoácidos (por ejemplo, aminoácidos 5 a 184 de SEQ ID N.º: 4),

Subsecuencia: El término "subsecuencia" significa un polinucleótido con uno o más (diferentes) nucleótidos eliminados del extremo 5' y/o 3' de una secuencia codificante del polipéptido maduro; donde la subsecuencia codifica un fragmento con actividad de proteasa. En un aspecto, una subsecuencia contiene al menos 504 nucleótidos (por ejemplo, nucleótidos 346 a 849 de SEQ ID N.º: 1), o por ejemplo, al menos 534 nucleótidos (por ejemplo, nucleótidos 331 a 864 de SEQ ID N.º: 1); o correspondientemente para SEQ ID NO:3 un fragmento contiene como mínimo 507 nucleótidos (por ejemplo nucleótidos 346 a 852 de SEQ ID N.º: 3) o por ejemplo como mínimo 540 nucleótidos (por ejemplo nucleótidos 328 a 867 de SEQ ID N.º: 3).

Variante alélica: el término "variante alélica" significa cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge naturalmente a través de la mutación, y puede resultar en polimorfismo dentro de poblaciones. Las mutaciones de genes pueden ser silenciosas (ningún cambio en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos alteradas. Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

Polinucleótido aislado: el término "polinucleótido aislado" significa un polinucleótido que se modifica por la mano humana con respecto al polinucleótido como se encuentra en la naturaleza. En un aspecto, el polinucleótido aislado es al menos 1% puro, por ejemplo, al menos 5% puro, más al menos 10% puro, al menos 20% puro, al menos 40% puro, al menos 60% puro, al menos 80% puro, al menos 90% puro, y al menos 95% puro, como se determina por electroforesis de agarosa. Los polinucleótidos pueden ser de origen genómico, cDNA, RNA, semisintético, sintético, o cualquier combinación de los mismos.

Polinucleótido sustancialmente puro: el término "polinucleótido sustancialmente puro" significa una preparación de polinucleótido libre de otros nucleótidos extraños o no deseados y en una forma adecuada para uso dentro de sistemas de producción de polipéptidos genéticamente modificados. Así, un polinucleótido sustancialmente puro contiene como mucho 10%, como mucho 8%, como mucho 6%, como mucho 5%, como mucho 4%, como mucho 3%, como mucho 2%, como mucho 1%, y como mucho 0,5% en peso de otro material de polinucleótido con el cual se asocia originalmente o recombinantemente. Un polinucleótido sustancialmente puro puede, sin embargo, incluir regiones no traducidas 5' y 3' de origen natural, tales como promotores y terminadores. Preferiblemente, el polinucleótido es al menos 90% puro, por ejemplo, al menos 92% puro, al menos 94% puro, al menos 95% puro, al menos 96% puro, al menos 97% puro, al menos 98% puro, al menos 99% puro, y al menos 99,5% en peso puro. Los polinucleótidos de la presente invención están preferiblemente en una forma sustancialmente pura.

Secuencia codificante: el término "secuencia codificante" significa un polinucleótido, que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de un polipéptido. Los límites de la secuencia codificante se determinan generalmente por un marco de lectura abierto, que empieza normalmente con el codón de inicio ATG o codones de inicio alternativos tales como GTG y TTG y termina con un codón de terminación tal como, TAA, TAG, y TGA. La secuencia codificante puede ser un DNA, cDNA, polinucleótido sintético o recombinante.

cDNA: el término "cDNA" significa una molécula de DNA que se puede preparar por transcripción inversa a partir de una molécula de RNAm madura, empalmada, obtenida a partir de una célula eucariota. cDNA carece de secuencias de intrones que pueden estar presentes en el DNA genómico correspondiente. El transcrito de RNA inicial primario es un precursor para RNAm que se procesa a través de una serie de pasos, incluyendo empalme, antes de aparecer como RNAm empalmado maduro.

Condiciones de alta astringencia: el término "condiciones de alta astringencia" significa sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 0,3% SDS, 200 microgramos/ml de DNA de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y 50% de formamida, después de procedimientos de Southern blotting estándar durante 12 a 24 horas. El material portador es finalmente lavado tres veces cada uno durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0,2% SDS a 65°C.

Condiciones de muy alta astringencia: el término "condiciones de muy alta astringencia" significa sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 0,3% SDS, 200

microgramos/ml de DNA de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y 50% de formamida, después de los procedimientos de Southern blotting estándar durante 12 a 24 horas. El material portador es finalmente lavado tres veces cada uno durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0,2% SDS a 70°C.

Constructo de ácidos nucleicos: el término "constructo de ácidos nucleicos" significa una molécula de ácido nucleico, bien mono- o bicatenario, que es aislada de un gen de origen natural o que se modifica para contener segmentos de ácidos nucleicos en cierto modo que de lo contrario no existiría en la naturaleza o que es sintético. El término constructo de ácidos nucleicos es sinónimo del término "cassette de expresión" cuando el constructo de ácidos nucleicos contiene las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia codificante de la presente invención.

Secuencias de control: el término "secuencias de control" significa todos los componentes necesarios para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa o exterior al polinucleótido que codifica el polipéptido o nativa o exterior entre sí. Tales secuencias de control incluyen, pero de forma no limitativa, una secuencia líder, de poliadenilación, secuencia de propéptido, de promotor, secuencia de péptido señal, y de terminador de transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor, y señales de parada transcripcional y traduccional. Las secuencias de control pueden ser provistas de enlaces con el fin de introducir sitios de restricción específicos que facilitan la unión de las secuencias de control con la región de codificación del polinucleótido que codifica un polipéptido.

Operativamente enlazado: el término "operativamente enlazado" significa una configuración en la que una secuencia de control se coloca en una posición apropiada relativa a la secuencia de codificación de un polinucleótido de modo que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia codificante.

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

Vector de expresión: el término "vector de expresión" significa una molécula de DNA lineal o circular que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido y está operativamente enlazada a nucleótidos adicionales que proveen su expresión.

Célula huésped: el término "célula huésped" significa cualquier tipo de célula que es susceptible de transformación, transfección, transducción, y similar, con un constructo de ácidos nucleicos o vector de expresión que comprende un polinucleótido de la presente invención. El término "célula huésped" abarca cualquier progenie de una célula madre que no es idéntica a la célula madre debido a mutaciones que ocurren durante la replicación.

Variante: el término "variante" significa un polipéptido con actividad de proteasa que comprende una alteración, es decir, una sustitución, inserción, y/o delección de uno o más (varios) residuos de aminoácidos en una o más (varias) posiciones. Una sustitución significa una sustitución de un aminoácido que ocupa una posición con un aminoácido diferente; una delección significa la delección de un aminoácido que ocupa una posición; y una inserción significa la adición de 1-3 aminoácidos adyacentes a un aminoácido que ocupa una posición.

40 Descripción detallada de la invención

Polipéptidos con actividad de proteasa

[0027] La presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen actividad de proteasa seleccionada del grupo que consiste en:

(a) un polipéptido con al menos 85% de identidad de secuencias al polipéptido maduro de SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:4;

(b) un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos 86% de identidad de secuencia a la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3 y/o

[0028] La presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen una identidad de secuencia al polipéptido maduro de SEQ ID NO:2 de al menos 85%, por ejemplo, al menos 87%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 93%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100%, que tiene actividad de proteasa. En un aspecto, los polipéptidos difieren de no más de diez aminoácidos, por ejemplo, de nueve aminoácidos, de ocho aminoácidos, de siete aminoácidos, de seis aminoácidos, de cinco aminoácidos, de cuatro aminoácidos, de tres aminoácidos, de dos aminoácidos, y de un aminoácido desde el polipéptido maduro de SEQ ID NO:2.

[0029] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos 87% de identidad de secuencia al polipéptido de SEQ ID N.º: 2.

[0030] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos 89% de identidad de secuencia al polipéptido de SEQ ID N.º: 2.

[0031] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos 90% de identidad de secuencia al polipéptido de SEQ ID N.º: 2.

- [0032] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos 93% de identidad de secuencia al polipéptido de SEQ ID N.º: 2.
- 5 [0033] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos 95% de identidad de secuencia al polipéptido de SEQ ID N.º: 2.
- [0034] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos 96% de identidad de secuencia al polipéptido de SEQ ID N.º: 2.
- 10 [0035] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos 97% de identidad de secuencia al polipéptido de SEQ ID N.º: 2.
- [0036] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos 98% de identidad de secuencia al polipéptido de SEQ ID N.º: 2.
- 15 [0037] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos 99% de identidad de secuencia al polipéptido de SEQ ID N.º: 2.
- [0038] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos 100% de identidad de secuencia al polipéptido de SEQ ID N.º: 2.
- 20 [0039] La presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen una identidad de secuencia al polipéptido maduro de SEQ ID NO:4 de al menos 85%, por ejemplo, al menos 87%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 93%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100%, que tienen actividad de proteasa. En un aspecto, los polipéptidos difieren de no más de veinticinco aminoácidos, por ejemplo, de veinte aminoácidos, de quince aminoácidos, de diez aminoácidos, de nueve aminoácidos, de ocho aminoácidos, de siete aminoácidos, de seis aminoácidos, de cinco aminoácidos, de cuatro aminoácidos, de tres aminoácidos, de dos aminoácidos, y de un aminoácido a partir del polipéptido maduro de SEQ ID NO:4.
- 25 [0040] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos 87% de identidad de secuencia al polipéptido de SEQ ID N.º: 4.
- [0041] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos 89% de identidad de secuencia al polipéptido de SEQ ID N.º: 4.
- 35 [0042] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos 90% de identidad de secuencia al polipéptido de SEQ ID N.º: 4.
- [0043] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos 93% de identidad de secuencia al polipéptido de SEQ ID N.º: 4.
- 40 [0044] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos 95% de identidad de secuencia al polipéptido de SEQ ID N.º: 4.
- [0045] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos 96% de identidad de secuencia al polipéptido de SEQ ID N.º: 4.
- 45 [0046] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos 97% de identidad de secuencia al polipéptido de SEQ ID N.º: 4.
- [0047] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos 98% de identidad de secuencia al polipéptido de SEQ ID N.º: 4.
- 50 [0048] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos 99% de identidad de secuencia al polipéptido de SEQ ID N.º: 4.
- [0049] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos 100% de identidad de secuencia al polipéptido de SEQ ID N.º: 4.
- 55 [0050] Un polipéptido de la presente invención preferiblemente comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4 o una variante alélica del mismo; o es un fragmento del mismo que tiene actividad de proteasa. En otro aspecto, el polipéptido comprende o consiste en el polipéptido maduro de SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4. En otro aspecto preferido, el polipéptido comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 188 de SEQ ID NO:2, o aminoácidos 1 a 189 de SEQ ID NO:4.
- 60 [0050] Un polipéptido de la presente invención preferiblemente comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4 o una variante alélica del mismo; o es un fragmento del mismo que tiene actividad de proteasa. En otro aspecto, el polipéptido comprende o consiste en el polipéptido maduro de SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4. En otro aspecto preferido, el polipéptido comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 188 de SEQ ID NO:2, o aminoácidos 1 a 189 de SEQ ID NO:4.
- 65

- [0051] La presente descripción también se refiere a polipéptidos aislados que tienen actividad de proteasa que se codifican por polinucleótidos que se hibridan bajo condiciones de alta astringencia, o condiciones de muy alta astringencia con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3, (ii) [la secuencia de DNA genómico que comprende] la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3, o (iii) la cadena complementaria en toda su longitud de (i) o (ii) (J. Sambrook, E.F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor, New York).
- [0052] El polinucleótido de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3 o una subsecuencia del mismo, al igual que la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4, o un fragmento de la misma, se puede utilizar para el diseño de sondas de ácidos nucleicos para identificar y clonar polipéptidos codificantes de DNA que tienen actividad de proteasa de cepas de diferentes géneros o especies según métodos bien conocidos en la técnica. En particular, tales sondas se pueden usar para hibridación con el cDNA o genómico del género o especie de interés, después de los procedimientos estándar de Southern blotting, para identificar y aislar el gen correspondiente en el mismo. Tales sondas pueden ser considerablemente más cortas que la secuencia entera, pero deberían ser al menos 14, por ejemplo, al menos 25, al menos 35, o al menos 70 nucleótidos de longitud. Preferiblemente, la sonda de ácidos nucleicos es al menos 100 nucleótidos de longitud, por ejemplo, al menos 200 nucleótidos, al menos 300 nucleótidos, al menos 400 nucleótidos, al menos 500 nucleótidos, al menos 600 nucleótidos, al menos 700 nucleótidos, al menos 800 nucleótidos, o al menos 900 nucleótidos de longitud. Tanto sondas de DNA como de RNA pueden usarse. Las sondas son típicamente marcadas para la detección del gen correspondiente (por ejemplo, con ^{32}P , ^3H , ^{35}S , biotina, o avidina). Tales sondas están comprendidas por la presente descripción.
- [0053] Un DNA genómico o genoteca de cDNA obtenido a partir de tales otras cepas se pueden seleccionar para DNA que se hibrida con las sondas anteriormente descritas y codifica un polipéptido con actividad de proteasa. DNA genómico u otro DNA de tales otras cepas se pueden separar por electroforesis en gel de poliacrilamida o agarosa, u otras técnicas de separación. El DNA de las bibliotecas o el DNA separado se puede transferir e inmovilizar en la nitrocelulosa u otro material portador adecuado. Para identificar un clon o DNA que es homólogo a SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3; o una subsecuencia de las mismas, el material portador es preferiblemente usado en un Southern blot.
- [0054] Para fines de la presente descripción, hibridación indica que el polinucleótido se hibrida a una sonda de ácidos nucleicos marcada que corresponde con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3 [la secuencia de DNA genómico que comprende] la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3; su cadena complementaria en toda su longitud; o una subsecuencia de la misma; bajo condiciones de astringencia muy baja a muy alta. Moléculas a las que la sonda de ácidos nucleicos se hibrida bajo estas condiciones se pueden detectar usando, por ejemplo, película radiográfica.
- [0055] En un aspecto, la sonda de ácidos nucleicos es la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3. En otro aspecto, la sonda de ácidos nucleicos es un fragmento de la misma. En otro aspecto, la sonda de ácidos nucleicos es un polinucleótido que codifica el polipéptido de SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4 o un fragmento de la misma. En otro aspecto preferido, la sonda de ácidos nucleicos es SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3.
- [0056] Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, condiciones de astringencia alta a muy alta son definidas como prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 0.3% SDS, 200 microgramos/ml de DNA de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y bien 25% formamida para astringencias muy baja y baja, 35% formamida para astringencias medias y medias altas, o 50% formamida para astringencias altas y muy altas, después de los procedimientos estándar de Southern blotting durante 12 a 24 horas óptimamente. El material portador es finalmente lavado tres veces cada uno durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0.2% SDS a 65°C (alta astringencia), y a 70°C (muy alta astringencia).
- [0057] Para sondas cortas de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, condiciones de astringencia son definidas como prehibridación e hibridación en alrededor de 5°C a aproximadamente 10°C por debajo de la T_m calculada utilizando el cálculo según Bolton y McCarthy (1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:1390) en 0,9 M DE NaCl, 0,09 M de Tris-HCl pH 7.6, 6 mM de EDTA, 0,5% de NP-40, 1X solución de Denhardt, 1 mM de pirofosfato de sodio, 1 mM de fosfato monobásico de sodio, 0,1 mM de ATP, y 0.2 mg de RNA de levadura por ml después de los procedimientos estándar de Southern blotting durante 12 a 24 horas óptimamente. El material portador se lava finalmente una vez en 6X SSC más 0,1 % de SDS durante 15 minutos y dos veces cada uno durante 15 minutos utilizando 6X SSC a 5°C a 10°C por debajo de la T_m calculada.
- [0058] La presente invención también se refiere a polipéptidos aislados que tienen actividad de proteasa codificada por polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia a la secuencia codificante del

polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 1 de al menos 86%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100%.

5 [0059] Una forma de realización de la invención es polipéptidos que tienen actividad de proteasa codificada por polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia a la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 1 de al menos 86%.

10 [0060] Una forma de realización de la invención es polipéptidos que tienen actividad de proteasa codificada por polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia a la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 1 de al menos 90%.

15 [0061] Una forma de realización de la invención es polipéptidos que tienen una actividad de proteasa codificada por polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia a la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 1 de al menos 95%.

[0062] Una forma de realización de la invención es polipéptidos que tienen una actividad de proteasa codificada por polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia a la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 1 de al menos 96%.

20 [0063] Una forma de realización de la invención es polipéptidos que tienen actividad de proteasa codificada por polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia a la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 1 de al menos 97%.

25 [0064] Una forma de realización de la invención es polipéptidos que tienen actividad de proteasa codificada por polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia a la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 1 de al menos 98%.

30 [0065] Una forma de realización de la invención es polipéptidos que tienen actividad de proteasa codificada por polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia a la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 1 de al menos 99%.

35 [0066] Una forma de realización de la invención es polipéptidos que tienen actividad de proteasa codificada por polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia a la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 1 de al menos 100%.

40 [0067] La presente invención también se refiere a polipéptidos aislados que tienen actividad de proteasa codificada por polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia a la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 3 de al menos 86%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100%.

[0068] Una forma de realización de la invención es polipéptidos que tienen actividad de proteasa codificada por polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia a la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 3 de al menos 86%.

45 [0069] Una forma de realización de la invención es polipéptidos que tienen actividad de proteasa codificada por polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia a la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 3 de al menos 90%.

50 [0070] Una forma de realización de la invención es polipéptidos que tienen actividad de proteasa codificada por polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia a la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 3 de al menos 95%.

55 [0071] Una forma de realización de la invención es polipéptidos que tienen actividad de proteasa codificada por polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia a la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 3 de al menos 96%.

[0072] Una forma de realización de la invención es polipéptidos que tienen actividad de proteasa codificada por polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia a la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 3 de al menos 97%.

60 [0073] Una forma de realización de la invención es polipéptidos que tienen actividad de proteasa codificada por polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia a la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 3 de al menos 98%.

[0074] Una forma de realización de la invención es polipéptidos que tienen actividad de proteasa codificada por polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia a la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 3 de al menos 99%.

5 [0075] Una forma de realización de la invención es polipéptidos que tienen actividad de proteasa codificada por polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia a la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 3 de al menos 100%.

10 [0076] En formas de realización particulares, las proteasas originales y/o las variantes de proteasa de la invención y para uso según la invención son seleccionadas del grupo que consiste en:

(a) proteasas del grupo enzimático EC 3.4.21 y

(b) serina proteasas de familia de peptidasa S1A; como se describe en *Biochem.J.* 290:205-218 (1993) y en la base de datos de proteasa MEROPS, publicación 9.5 (www.merops.ac.uk). La base de datos es descrita en Rawlings, N.D., Barrett, A.J. & Bateman, A. (2010) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 38, D227-D233.

15 [0077] Para determinar si una proteasa dada es una proteasa serínica, y una proteasa de familia S1A, se hace referencia al manual anterior y los principios indicados en este. Tal determinación puede llevarse a cabo para todos tipos de proteasas, siendo estas proteasas de origen natural o de tipo salvaje; o proteasas modificadas genéticamente o sintéticas.

20 [0078] La presente invención también se refiere a variantes que tienen actividad de proteasa y al menos 85% de identidad de secuencia al polipéptido maduro de SEQ ID NO:2 y/o SEQ ID NO:4, que comprende una sustitución, deleción, y/o inserción de uno o más (o diferentes) aminoácidos del polipéptido maduro de SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4. Preferiblemente, cambios aminoácidos son de una naturaleza menor, que las sustituciones o inserciones de aminoácidos conservadoras que significativamente no afectan al pliegue y/o actividad de la proteína; deleciones pequeñas, típicamente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; pequeñas extensiones amino o carboxilo terminales, tal como un residuo de metionina aminoterminal; un pequeño péptido enlazador de hasta aproximadamente 20-25 residuos; o una pequeña extensión que facilita la purificación cambiando la carga neta u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión.

25 [0079] Ejemplos de sustituciones conservadoras están en el grupo de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina). Sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran la actividad específica se conocen en la técnica y son descritas, por ejemplo, por H. Neurath y R.L. Hill, 1979, en *The Proteins*, Academic Press, New York. Los intercambios que ocurren con más frecuencia son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, y Asp/Gly.

35 [0080] Alternativamente, los cambios de aminoácidos son de tal naturaleza que las propiedades físico químicas de los polipéptidos son alteradas. Por ejemplo, cambios de aminoácidos pueden mejorar la termoestabilidad del polipéptido, alterar la especificidad de sustrato, cambiar el pH óptimo, y similar. Aminoácidos esenciales en un polipéptido progenitor se pueden identificar según procedimientos conocidos en la técnica, tal como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de escaneado de alanina (Cunningham y Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085). En la técnica anterior, mutaciones de alanina únicas se introducen en cada residuo en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se evalúan para la actividad de proteasa para identificar residuos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula. Véase también, Hilton et al., 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 4699-4708. El sitio activo de la enzima u otra interacción biológica puede también ser determinado por análisis físico de estructura, como se determina por tales técnicas como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción electrónica, o marcaje por fotoafinidad, conjuntamente con mutación de aminoácidos de sitio de contacto putativo. Véase, por ejemplo, de Vos et al., 1992, *Science* 255: 306-312; Smith et al., 1992, *J. Mol. Biol.* 224: 899-904; Wlodaver et al., 1992, *FEBS Lett.* 309: 59-64. Las identidades de aminoácidos esenciales también pueden ser inferidas de análisis de identidades con polipéptidos que se relacionan con el polipéptido progenitor.

45 [0081] Sustituciones de aminoácidos únicas o múltiples, deleciones, y/o inserciones pueden ser hechas y evaluadas usando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación, y/o redistribución, seguido de un procedimiento de selección pertinente, tal como los descritos por Reidhaar-Olson y Sauer, 1988, *Science* 241: 53-57; Bowie and Sauer, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2152-2156; WO 95/17413; o WO 95/22625. Otros métodos que se pueden usar incluyen PCR con tendencia al error, presentación en fagos (por ejemplo, Lowman et al., 1991, *Biochemistry* 30: 10832-10837; patente norteamericana n° 5,223,409; WO 92/06204), y mutagénesis dirigida a la región (Derbyshire et al., 1986, *Gene* 46: 145; Ner et al., 1988, *DNA* 7: 127).

[0082] Métodos de mutagénesis/redistribución se pueden combinar con alto rendimiento, métodos de selección automatizados para detectar actividad de polipéptidos clonados, mutagenizados, expresados por células huésped (Ness et al., 1999, Nature Biotechnology 17: 893-896). Moléculas de DNA mutagenizadas que codifican polipéptidos activos se pueden recuperar de las células huésped y secuenciar rápidamente usando métodos estándar en la técnica. Estos métodos permiten la determinación rápida de la importancia de residuos de aminoácidos individuales en un polipéptido.

[0083] El número total de sustituciones de aminoácidos, deleciones y/o inserciones del polipéptido maduro de SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4 no es más del 20, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20.

[0084] El polipéptido puede ser un polipéptido híbrido donde una porción de un polipéptido se fusiona en el N-término o el C-término de una porción de otro polipéptido.

[0085] El polipéptido puede ser un polipéptido fusionado o polipéptido de fusión escindible donde otro polipéptido se fusiona en el N-término o el C-término del polipéptido de la presente invención. Un polipéptido fusionado se produce por la fusión de un polinucleótido que codifica otro polipéptido a un polinucleótido de la presente invención. Técnicas para producir polipéptidos de fusión se conocen en la técnica, e incluyen la unión de las secuencias codificantes que codifican los polipéptidos de modo que éstas están en marco y que la expresión del polipéptido fusionado esté bajo control del(los) mismo(s) promotor(es) y terminador. Proteínas de fusión también se pueden construir usando la tecnología de inteína donde se crean fusiones postraduccionales (Cooper et al., 1993, EMBO J. 12: 2575-2583; Dawson et al., 1994, Science 266: 776-779).

[0086] Un polipéptido de fusión puede además comprender un sitio de escisión entre los dos polipéptidos. En la secreción de la proteína de fusión, el sitio es dividido liberando los dos polipéptidos. Ejemplos de sitios de escisión incluyen, pero de forma no limitativa, los sitios descritos en Martin et al., 2003, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 3: 568-576; Svetina et al., 2000, J. Biotechnol. 76: 245-251; Rasmussen-Wilson et al., 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63: 3488-3493; cuadro et al., 1995, Biotechnology 13: 498-503; y Contreras et al., 1991, Biotechnology 9: 378-381; Eaton et al., 1986, Biochemistry 25: 505-512; Collins-Racie et al., 1995, Biotechnology 13: 982-987; Carter et al., 1989, Proteins: Structure, Function, and Genetics 6: 240-248; y Stevens, 2003, Drug Discovery World 4: 35-48.

[0087] Las proteasas de la invención presentan propiedades de pH sorprendentes, especialmente estabilidad de pH y propiedades de actividad de pH, especialmente a valores de pH bajos, que las convierten en candidatos interesantes para usar en el pienso para animales y detergentes.

Formas de realización

[0088] En formas de realización determinadas de la invención, la proteasa de la invención muestra propiedades térmicas beneficiosas tal como termoestabilidad, estabilidad en vapor, etc y/o propiedades de pH, tal como estabilidad en ácido, pH óptimo, etc.

[0089] Una forma de realización de la invención es polipéptidos aislados que tienen actividad de proteasa mejorada entre pH 4 y 9, tal como entre pH 5 y 8, tal como a pH 5, a pH 6, a pH 7 o a pH 8, a 25°C en comparación con proteasa 10R.

[0090] Una forma de realización adicional de la invención es actividad de proteasa mejorada en la harina de soja-maíz entre pH 3.0 y 6.0 y 40°C, tal como a pH 3.0, a pH 4.0, a pH 5.0 o a pH 6.0, en comparación con proteasa 10R.

Propiedades de acidez/alcalinidad

[0091] En formas de realización determinadas de la invención la proteasa de la invención muestra pH con respecto a propiedades beneficiosas, tal como estabilidad en ácido, pH óptimo, etc. La estabilidad de la proteasa a un pH bajo es beneficiosa ya que la proteasa puede tener actividad en el intestino después de pasar a través del estómago. En una forma de realización de la invención la proteasa retiene >95% de actividad después de 2 horas a pH 3 según se determina usando el método descrito en el ejemplo 3.

Termoestabilidad

[0092] Termoestabilidad se puede determinar como se describe en el ejemplo 6, es decir usando mediciones de DSC para determinar la temperatura de desnaturalización, T_d , de la proteína de proteasa purificada. La T_d es indicativa de la termoestabilidad de la proteína: a mayor T_d , mayor termoestabilidad. Por consiguiente, en una forma de realización preferida, la proteasa de la invención tiene una T_d que es superior a la T_d de una

proteasa de referencia, donde T_d se determina en las muestras de proteasa purificada (preferiblemente con una pureza de al menos 90% o 95%, como se determina por SDS-PAGE).

5 [0093] En formas de realización preferidas, las propiedades térmicas tal como estabilidad térmica, estabilidad de temperatura, termoestabilidad, estabilidad de vapor, y/o estabilidad de granulación como está provista por la actividad residual, temperatura de desnaturalización T_d , u otro parámetro de la proteasa de la invención es superior al valor correspondiente, como la actividad residual o T_d , de la proteasa de SEQ ID NO:5, más preferiblemente al menos 101% de la misma, o al menos 102%, 103%, 104%, 105%, 106%, 107%, 108%, 109%, o al menos 110% de la misma. Aún más preferiblemente, el valor del parámetro, tal como actividad residual o T_d , de la proteasa de la invención es al menos 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, o al menos 190% del valor para la proteasa de SEQ ID NO:5.

15 [0094] En todavía otras formas de realización particulares, la proteasa termoestable de la invención tiene una temperatura de fusión, T_m (o una temperatura de desnaturalización, T_d), como se determina usando calorimetría diferencial de barrido (DSC) como se describe en el ejemplo 10 (es decir en 20 mM de acetato sódico, pH 4.0), de al menos 50°C. En todavía otras formas de realización particulares, la T_m es al menos 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98,99 o al menos 100°C.

20 Estabilidad en vapor

[0095] La estabilidad en vapor se puede determinar como se describe en el ejemplo 7 determinando la actividad residual de moléculas de proteasa después del tratamiento con vapor a 85°C o 90°C durante un periodo corto.

25

Estabilidad de granulación

[0096] La estabilidad de granulación se puede determinar como se describe en el ejemplo 8 usando granulado enzimático premezclado con pienso. Desde el mezclador el pienso se acondiciona con vapor a 95°C. Después de la preparación del pienso se prensa hasta gránulos y la actividad residual determinada.

30

Fuentes de polipéptidos con actividad de proteasa

35 [0097] Un polipéptido con actividad de proteasa de la presente invención se puede obtener de microorganismos de cualquier género. Para fines de la presente invención, el término "obtenido de" como se utiliza en este caso en relación con una fuente dada debe significar que el polipéptido codificado por un polinucleótido se produce por la fuente o por una cepa donde el polinucleótido de la fuente ha sido insertado. En un aspecto, el polipéptido obtenido a partir de una fuente dada es secretado extracelularmente.

40 [0098] El polipéptido puede ser un polipéptido bacteriano. Por ejemplo, el polipéptido puede ser un polipéptido con actividad de proteasa a partir de una bacteria gram-positiva dentro de un filo tal como Actinobacteria o a partir de una bacteria gram-negativa dentro de un filo tal como Proteobacteria.

45 [0099] En un aspecto, el polipéptido es una proteasa a partir de una bacteria de la clase *Actinobacteria*, tal como del orden de los actinomicetales, o del suborden Propionibacterineae, o de la familia *Nocardioideaceae*, o de los géneros *Kribbella*, *Saccharomonospora*, *Saccharopolyspora*; o *Amycolatopsis*.

50 [0100] Cepas de estos taxones son accesibles fácilmente al público en un número de colecciones de cultivo, tal como la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS), y colección de cultivos para Patentes del Servicio de Investigación Agrícola, Northern Regional Research Center (NRRL).

55 [0101] El polipéptido se puede identificar y obtener de otras fuentes incluyendo microorganismos aislados de la naturaleza (por ejemplo, suelo, abonos, agua, etc.) utilizando las sondas anteriormente mencionadas. Técnicas para el aislamiento de microorganismos de hábitats naturales se conocen en la técnica. El polinucleótido que codifica el polipéptido puede luego ser obtenido por cribado de forma similar de una genoteca de cDNA o genómica de otro microorganismo o muestra de DNA mezclado. Una vez un polinucleótido que codifica un polipéptido ha sido detectado con la(s) sonda(s), el polinucleótido se puede aislar o clonar por la utilización de técnicas que son bien conocidas por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, supra).

60

Polinucleótidos

65 [0102] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican un polipéptido de la presente invención.

[0103] Las técnicas usadas para aislar o clonar un polinucleótido que codifica un polipéptido se conocen en la técnica e incluyen aislamiento de DNA genómico, preparación de cDNA, o una combinación de las mismas. La clonación de los polinucleótidos de tal DNA genómico puede ser efectuada, por ejemplo, usando la reacción en cadena de polimerasa (PCR) bien conocida o cribado de anticuerpos de bibliotecas de expresión para detectar fragmentos de DNA clonados con características estructurales compartidas. Véase, por ejemplo, Innis et al., 1990, PCR: A Guide to Methods and Application, Academic Press, New York. Otros procedimientos de amplificación de ácido nucleico tal como reacción en cadena de la ligasa (LCR), transcripción activada por ligamiento (LAT) y amplificación basada en polinucleótidos (NASBA) pueden ser utilizados. Los polinucleótidos se pueden clonar a partir de una cepa de *Kribbella*, u otro u organismo relacionado a partir de los actinomicetales y así, por ejemplo, puede ser una variante alélica o de especies de la región codificante de polipéptidos del polinucleótido.

[0104] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que comprenden o consisten en polinucleótidos con un grado de identidad de secuencias a la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3 de al menos 86%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100%, que codifica un polipéptido con actividad de proteasa.

[0105] La modificación de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser necesaria para la síntesis de polipéptidos sustancialmente similares al polipéptido. El término "sustancialmente similar" al polipéptido se refiere a formas que no se originan de forma natural del polipéptido. Estos polipéptidos pueden diferir en alguna vía diseñada del polipéptido aislado de su fuente nativa, por ejemplo, variantes que difieren en la actividad específica, termoestabilidad, pH óptimo, o similar. La variante se puede construir basándose en el polinucleótido presentado como la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3, por ejemplo, una subsecuencia de la misma, y/o por introducción de sustituciones de nucleótidos que no suponen un cambio en la secuencia de aminoácidos del polipéptido, pero que corresponden al uso del codón del organismo huésped destinado para la producción de la enzima, o por introducción de sustituciones de nucleótidos que pueden dar lugar a una secuencia de aminoácidos diferente. Para una descripción general de sustitución de nucleótidos, véase, por ejemplo, Ford et al., 1991, Protein Expression and Purification 2: 95-107.

[0106] La presente descripción también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican polipéptidos de la presente invención, que se hibridan bajo condiciones de astringencia muy baja, condiciones de astringencia baja, condiciones de astringencia media, condiciones de astringencia media alta, condiciones de astringencia alta, o condiciones de astringencia muy alta con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3, (ii) la secuencia de DNA genómico que comprende la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3, o (iii) la cadena complementaria en toda su longitud de (i) o (ii); o variantes alélicas y subsecuencias de las mismas (Sambrook et al., 1989, supra), tal y como se define aquí.

[0107] En un aspecto, el polinucleótido comprende o consiste en SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3, la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 1, o una subsecuencia de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3 que codifica un fragmento de SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4 que tiene actividad de proteasa, tal como el polinucleótido de nucleótidos 316 a 879 de SEQ ID NO:1 o nucleótidos 316 a 882 SEQ ID NO:3.

45 **Constructos de ácidos nucleicos**

[0108] La presente invención también se refiere a constructos de ácidos nucleicos que comprenden un polinucleótido de la presente invención operativamente enlazada a una o más (diferentes) secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

[0109] Un polinucleótido se puede manipular en una variedad de vías para proveer la expresión del polipéptido. La manipulación del polinucleótido antes de la inserción en un vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para modificar polinucleótidos utilizando métodos de DNA recombinante se conocen en la técnica.

[0110] La secuencia de control puede ser una secuencia de promotor, un polinucleótido que se reconoce por una célula huésped para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. La secuencia del promotor contiene secuencias de control transcripcionales que median la expresión del polipéptido. El promotor puede ser cualquier polinucleótido que muestra actividad transcripcional en la célula huésped de elección incluyendo promotores mutantes, truncados, e híbridos, y se pueden obtener de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares bien homólogos o heterólogos a la célula huésped.

[0111] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácidos nucleicos de la presente invención en una célula huésped bacteriana son los promotores obtenidos del gen de alfa-

- amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (*amyQ*), gen de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (*amyL*), gen de penicilinas de *Bacillus licheniformis* (*penP*), gen de amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus* (*amyM*), gen de levansucrasa de *Bacillus subtilis* (*sacB*), genes *xylA* y *xylB* de *Bacillus subtilis*, operón *lac* de *E. Coli*, gen de agarasa de *Streptomyces coelicolor* (*dagA*), y gen de beta-lactamasa procarionta (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 3727-3731), al igual que el promotor *tac* (DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 21-25). Otros promotores son descritos en "Useful proteins from recombinant bacteria" en Gilbert et al., 1980, Scientific American, 242: 74-94; y en Sambrook et al., 1989, supra.
- [0112] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácidos nucleicos de la presente invención en una célula huésped fúngica filamentosa son promotores obtenidos de los genes para acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, alfa-amilasa estable en ácido de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger* o *Aspergillus awamori* (*glaA*), TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*, proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), amiloglucosidasa de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), *Fusarium venenatum* Daria (WO 00/56900), *Fusarium venenatum* Quinn (WO 00/56900), lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa I de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa IV de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, xilanasa I de *Trichoderma reesei*, xilanasa II de *Trichoderma reesei*, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei*, al igual que el promotor NA2-tpi (un promotor modificado que incluye un gen que codifica una alfa-amilasa neutra en *Aspergilli* donde el líder no traducido ha sido sustituido por un líder no traducido de gen que codifica la triosa fosfato isomerasa en *Aspergilli*; ejemplos no limitativos incluyen promotores modificados con la alfa-amilasa neutra en *Aspergillus niger* donde el líder no traducido ha sido sustituido por un líder no traducido del gen que codifica la triosa fosfato isomerasa en el *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae*); y promotores mutantes, truncados, e híbridos de los mismos.
- [0113] En un huésped de levadura, promotores útiles se obtienen de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), galactocinasa de *Saccharomyces cerevisiae* (GAL1), alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH1, aDH2/GAP), triosa fosfato isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae* (TPI), metalotioneína de *Saccharomyces cerevisiae* (CUP1), y quinasa de 3-fosfoglicerato de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros promotores útiles para células huésped de levadura son descritos por Romanos et al., 1992, Yeast 8: 423-488.
- [0114] La secuencia de control también puede ser una secuencia del terminador de la transcripción adecuada, que se reconoce por una célula huésped para terminar la transcripción. La secuencia terminadora está operativamente enlazada al término 3' del polinucleótido que codifica el polipéptido. Cualquier terminador que es funcional en la célula huésped de elección se puede utilizar en la presente invención.
- [0115] Terminadores preferidos para células huésped fúngicas filamentosas son obtenidos de los genes para antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, y proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.
- [0116] Terminadores preferidos para células huésped de levadura son obtenidos de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, citocromo de *Saccharomyces cerevisiae* C (CYC1), y gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros terminadores útiles para células huésped de levadura son descritos por Romanos et al., 1992, supra.
- [0117] La secuencia de control también puede ser una secuencia líder adecuada, cuando el transcrito está en una región no traducida de un RNAm que es importante para la traducción por la célula huésped. La secuencia líder está operativamente enlazada al término 5' del polinucleótido que codifica el polipéptido. Cualquier secuencia líder que es funcional en la célula huésped de elección puede ser utilizada.
- [0118] Líderes preferidos para células huésped fúngicas filamentosas son obtenidos de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.
- [0119] Líderes adecuados para células huéspedes de levadura son obtenidos de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae*, y alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH2/GAP).
- [0120] La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia operativamente enlazada al término 3' del polinucleótido y, cuando se transcribe, se reconoce por la célula huésped como una señal para añadir residuos de poliadenosina al mRNA transcrito. Cualquier secuencia de poliadenilación que es funcional en la célula huésped de elección puede ser utilizada.

- 5 [0121] Secuencias de poliadenilación preferidas para células huéspedes fúngicas filamentosas son obtenidas de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*, y alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*.
- [0122] Secuencias de poliadenilación útiles para células huéspedes de levadura son descritas por Guo y Sherman, 1995, Mol. Cellular Biol. 15: 5983-5990.
- 10 [0123] La secuencia de control también puede ser una región codificante del péptido señal que codifica un péptido señal enlazado al N-término de un polipéptido y dirige el polipéptido en la vía secretora de la célula. El extremo 5' de la secuencia codificante del polinucleótido puede intrínsecamente contener una secuencia codificante del péptido señal naturalmente enlazado en el marco de lectura de traducción con el segmento de la secuencia codificante que codifica el polipéptido. Alternativamente, el extremo 5' de la secuencia codificante puede contener una secuencia codificante del péptido señal que es exterior a la secuencia codificante. La secuencia codificante del péptido señal exterior se puede requerir donde la secuencia codificante no contienen de forma natural una secuencia codificante del péptido señal. Alternativamente, la secuencia codificante del péptido señal foráneo puede sencillamente reemplazar la secuencia codificante del péptido señal natural para mejorar la secreción del polipéptido. Sin embargo, cualquier secuencia codificante del péptido señal que dirige el polipéptido expresado en la vía secretora de una célula huésped de elección puede ser utilizada.
- 15 [0124] Secuencias codificantes del péptido señal eficaces para células huésped bacterianas son las secuencias codificantes del péptido señal obtenidas de los genes para amilasa maltogénica de *Bacillus* NCIB 11837, subtilisina de *Bacillus licheniformis*, beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis*, alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, proteasas neutras de *Bacillus stearothermophilus* (*nprT*, *nprS*, *nprM*), y *prsA* de *Bacillus subtilis*. Otros péptidos señal son descritos por Simonen y Palva, 1993, Microbiological Reviews 57: 109-137.
- 25 [0125] Secuencias codificantes del péptido señal eficaces para células huésped fúngicas filamentosas son las secuencias codificantes del péptido señal obtenidas a partir de los genes para amilasa neutra de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, celulasa de *Humicola insolens*, endoglucanasa V de *Humicola insolens*, lipasa de *Humicola lanuginosa*, y proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*.
- 30 [0126] Péptidos señal útiles para células huésped de levadura son obtenidos de los genes para alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae* e invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otras secuencias codificantes del péptido señal útiles son descritas por Romanos et al., 1992, supra.
- 35 [0127] La secuencia de control también puede ser una secuencia codificante del propéptido que codifica un propéptido posicionado en el N-término de un polipéptido. El polipéptido resultante es conocido como una proenzima o propolipéptido (o un zimógeno en algunos casos). Un propolipéptido es inactivo generalmente y se puede convertir en un polipéptido activo por escisión catalítica o autocatalítica del propéptido a partir del propolipéptido. La secuencia codificante del propéptido se puede obtener a partir los genes para proteasa alcalina de *Bacillus subtilis* (*aprE*), proteasa neutra de *Bacillus subtilis* (*nprT*), lacasa myceliophthora *thermophila* (WO 95/33836), proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, y alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae*.
- 40 [0128] Cuando ambas secuencias de péptido señal y de propéptido están presentes en el N-término de un polipéptido, la secuencia de propéptido está situada junto al N-término de un polipéptido y la secuencia de péptido señal está situada junto al N-término de la secuencia del propéptido.
- 45 [0129] También puede ser deseable añadir secuencias reguladoras que permiten la regulación de la expresión del polipéptido relativo al crecimiento de la célula huésped. Ejemplos de sistemas reguladores son aquellos que causan la expresión del gen que se debe activar o desactivar en respuesta a una sustancia química o estímulo físico, con la presencia de un compuesto regulador. Sistemas reguladores en sistemas procariotas incluyen los sistemas de los operadores lac, tac, y trp. En la levadura, el sistema ADH2 o sistema GAL1 puede ser utilizado. En hongos filamentosos, el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger*, promotor de TAKA alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae*, y promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae* puede ser utilizado. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son aquellas que permiten la amplificación génica. En sistemas eucarióticos, estas secuencias reguladoras incluyen el gen de dihidrofolato reductasa que se amplifica en presencia de metotrexato, y los genes de metalotioneína que se amplifican con metales pesados. En estos casos, el polinucleótido que codifica el polipéptido sería operativamente enlazado con la secuencia reguladora.
- 55 [0130] También puede ser deseable añadir secuencias reguladoras que permiten la regulación de la expresión del polipéptido relativo al crecimiento de la célula huésped. Ejemplos de sistemas reguladores son aquellos que causan la expresión del gen que se debe activar o desactivar en respuesta a una sustancia química o estímulo físico, con la presencia de un compuesto regulador. Sistemas reguladores en sistemas procariotas incluyen los sistemas de los operadores lac, tac, y trp. En la levadura, el sistema ADH2 o sistema GAL1 puede ser utilizado. En hongos filamentosos, el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger*, promotor de TAKA alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae*, y promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae* puede ser utilizado. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son aquellas que permiten la amplificación génica. En sistemas eucarióticos, estas secuencias reguladoras incluyen el gen de dihidrofolato reductasa que se amplifica en presencia de metotrexato, y los genes de metalotioneína que se amplifican con metales pesados. En estos casos, el polinucleótido que codifica el polipéptido sería operativamente enlazado con la secuencia reguladora.
- 60 [0131] También puede ser deseable añadir secuencias reguladoras que permiten la regulación de la expresión del polipéptido relativo al crecimiento de la célula huésped. Ejemplos de sistemas reguladores son aquellos que causan la expresión del gen que se debe activar o desactivar en respuesta a una sustancia química o estímulo físico, con la presencia de un compuesto regulador. Sistemas reguladores en sistemas procariotas incluyen los sistemas de los operadores lac, tac, y trp. En la levadura, el sistema ADH2 o sistema GAL1 puede ser utilizado. En hongos filamentosos, el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger*, promotor de TAKA alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae*, y promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae* puede ser utilizado. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son aquellas que permiten la amplificación génica. En sistemas eucarióticos, estas secuencias reguladoras incluyen el gen de dihidrofolato reductasa que se amplifica en presencia de metotrexato, y los genes de metalotioneína que se amplifican con metales pesados. En estos casos, el polinucleótido que codifica el polipéptido sería operativamente enlazado con la secuencia reguladora.
- 65 **Vectores de expresión**

[0130] La presente invención también se refiere a vectores de expresión recombinantes que comprenden un polinucleótido de la presente invención, un promotor, y señales de parada transcripcional y traduccional. Las distintas secuencias de nucleótidos y de control se pueden unir entre sí para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más (varios) sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o sustitución del polinucleótido que codifica el polipéptido en tales sitios. De forma alternativa, el polinucleótido se puede expresar por la inserción del polinucleótido o un constructo de ácidos nucleicos que comprende la secuencia en un vector apropiado para la expresión. En la creación del vector de expresión, la secuencia codificante se localiza en el vector de modo que la secuencia codificante es operativamente enlazada con las secuencias de control apropiadas para la expresión.

[0131] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o virus) que puede ser convenientemente sometido a procedimientos de DNA recombinante y pueden provocar la expresión del polinucleótido. La elección del vector típicamente dependerá de la compatibilidad del vector con la célula huésped en que el vector debe ser introducido. El vector puede ser un plásmido lineal o circular cerrado.

[0132] El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma, o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula huésped, se integra en el genoma y se replica con el(los) cromosoma(s) en el(los) que se ha integrado. Además, un único vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el DNA total que se debe introducir en el genoma de la célula huésped, o un transposón, puede ser utilizado.

[0133] El vector contiene preferiblemente uno o más (varios) marcadores seleccionables que permiten la selección fácil de células transformadas, transfectadas, transducidas, o similares. Un marcador seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia biocida o vírica, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos, y similar.

[0134] Ejemplos de marcadores seleccionables bacterianos son los genes *dal* de *Bacillus subtilis* o *Bacillus licheniformis*, o marcadores que confieren resistencia a antibióticos tal como resistencia a la ampicilina, cloranfenicol, canamicina, o tetraciclina. Marcadores adecuados para células huésped de levadura son ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1, y URA3. Marcadores seleccionables para usar en una célula huésped fúngica filamentosa incluyen, pero de forma no limitativa, *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina-carbamoiltransferasa), *bar* (fosfonitrícina acetiltransferasa), *hph* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrato-reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato-descarboxilasa), *sC* (sulfato adeniltransferasa), y *trpC* (antranilato sintasa), al igual que equivalentes de los mismos. Se prefieren para el uso en una célula de *Aspergillus* los genes *amdS* y *pyrG* de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y el gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*.

[0135] El vector contiene preferiblemente un(os) elemento(s) que permite(n) la integración del vector en el genoma de la célula huésped o replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.

[0136] Para integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede depender de la secuencia del polinucleótido que codifica el polipéptido o cualquier otro elemento del vector para integración en el genoma por recombinación homóloga o no homóloga. Alternativamente, el vector puede contener polinucleótidos adicionales para dirigir la integración por recombinación homóloga en el genoma de la célula huésped en una(s) ubicación(es) precisa(s) en el(los) cromosoma(s). Para aumentar la probabilidad de integración en una ubicación precisa, los elementos integracionales deberían contener un número suficiente de ácidos nucleicos, tal como 100 a 10.000 pares de bases, 400 a 10.000 pares de bases, y 800 a 10.000 pares de bases, que tienen un alto grado de identidad de secuencia a la secuencia objetivo correspondiente para mejorar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos integracionales pueden ser cualquier secuencia que es homóloga a la secuencia objetivo en el genoma de la célula huésped. Además, los elementos integracionales pueden ser polinucleótidos codificantes o no codificantes. Por otro lado, el vector se puede integrar en el genoma de la célula huésped por recombinación no homóloga.

[0137] Para replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación que permite al vector replicarse de forma autónoma en la célula huésped en cuestión. El origen de replicación puede ser cualquier replicador del plásmido que media la replicación autónoma que funciona en una célula. El término "origen de replicación" o "replicador de plásmido" significa un polinucleótido que permite que un plásmido o vector se replique *in vivo*.

[0138] Ejemplos de orígenes bacterianos de replicación son los orígenes de replicación de plásmidos pBR322; pUC19; pACYC177, y pACYC184 que permiten la replicación en *E. Coli*, y pUB110; pE194; pTA1060, y pAM β 1 que permite la replicación en *Bacillus*.

[0139] Ejemplos de orígenes de replicación para usar en una célula huésped de levadura son el origen de replicación de 2 micras, ARS1, ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3, y la combinación de ARS4 y CEN6.

5 [0140] Ejemplos de orígenes de replicación útiles en una célula fúngica filamentosa son AMA1 y ANS1 (Gems et al., 1991, Gene 98: 61-67; Cullen et al., 1987, Nucleic Acids Res. 15: 9163-9175; WO 00/24883). Aislamiento del gen AMA1 y construcción de plásmidos o vectores que comprenden el gen que se puede realizar según los métodos descritos en WO 00/24883.

10 [0141] Más de una copia de un polinucleótido de la presente invención se puede insertar en una célula huésped para aumentar la producción de un polipéptido. Un aumento en el número de copias del polinucleótido puede ser obtenido por la integración de al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped o por la inclusión de un gen marcador seleccionable amplificable con el polinucleótido donde células que contienen copias amplificadas del gen marcador seleccionable, y por lo
15 tanto copias adicionales del polinucleótido, se pueden seleccionar por el cultivo de las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

[0142] Los procedimientos usados para enlazar los elementos anteriormente descritos para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención se conocen por un experto en la materia
20 (véase, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, supra).

Células huésped

[0143] La presente invención también se refiere a células huésped recombinantes, que comprenden un polinucleótido de la presente invención operativamente enlazada a una o más (diferentes) secuencias de control que dirigen la producción de un polipéptido de la presente invención. Un constructo o vector que comprende un polinucleótido se introduce en una célula huésped de modo que el constructo o vector es mantenido como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico que se duplica como se ha descrito anteriormente. El término "célula huésped" abarca cualquier progenie de una célula madre que no es
25 idéntica a la célula madre debido a mutaciones que ocurren durante la replicación. La elección de una célula huésped dependerá en gran parte del gen que codifica el polipéptido y su fuente.

[0144] La célula huésped puede ser cualquier célula útil en la producción recombinante de un polipéptido de la presente invención, por ejemplo, un procarionta o un eucariota.
35

[0145] La célula huésped procarionta puede ser cualquier bacteria gram-positiva o gram-negativa. Bacterias gram-positivas incluyen, pero de forma no limitativa, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Clostridium*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Paenibacillus*, y *Streptomyces*. Bacterias gram-negativas incluyen, pero de forma no limitativa *E. Coli*, y *Pseudomonas*.
40

[0146] La célula huésped bacteriana puede ser cualquier célula de *Bacillales* incluidas, pero sin limitarse a, células de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Brevibacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, y *Bacillus thuringiensis*.
45

[0147] La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptomyces* incluidas, pero sin limitarse a, células de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus*, y *Streptomyces lividans*.

[0148] La introducción de DNA en una célula de *Bacillus* puede, por ejemplo, ser efectuada por transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, Chang y Cohen, 1979, Mol. Gen. Genet. 168: 111-115), usando células competentes (véase, por ejemplo, Young y Spizizen, 1961, J. Bacteriol. 81: 823-829, o Dubnau y Davidoff-Abelson, 1971, J. Mol. Biol. 56: 209-221), por electroporación (véase, por ejemplo, Shigekawa y Dower, 1988, Biotechniques 6: 742-751), o por conjugación (véase, por ejemplo, Koehler y Thorne, 1987, J. Bacteriol. 169: 5271-5278). La introducción de DNA en una célula de *E. coli* puede, por ejemplo, ser efectuada por transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166: 557-580) o electroporación (véase, por ejemplo, Dower et al., 1988, Nucleic Acids Res. 16: 6127-6145). La introducción de DNA en una célula de *Streptomyces* puede, por ejemplo, ser efectuada por transformación de protoplasto y electroporación (véase, por ejemplo, Gong et al., 2004, Folia Microbiol. (Praga) 49: 399-405), por conjugación (véase, por ejemplo, Mazodier et al., 1989, J. Bacteriol. 171: 3583-3585), o por transducción (véase, por ejemplo, Burke et al., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 6289-6294). La introducción de DNA en una célula de *Pseudomonas* puede, por ejemplo, ser efectuada por electroporación (véase, por ejemplo, Choi et al., 2006, J. Microbiol. Methods 64: 391-397) o por conjugación (véase, por ejemplo, Pinedo y Smets, 2005, Appl. Environ. Microbiol. 71: 51-57). La introducción de DNA en una célula de *Streptococcus* puede, por ejemplo, ser efectuada por competencia natural (véase, por ejemplo, Perry and Kuramitsu, 1981, Infect. Immun. 32: 1295-1297), por transformación de protoplasto (véase, por ejemplo, Catt y Jollick, 1991, Microbios
50
55
60
65

68: 189-207, por electroporación (véase, por ejemplo, Buckley et al., 1999, Appl. Environ. Microbiol. 65: 3800-3804) o por conjugación (véase, por ejemplo, Clewell, 1981, Microbiol. Rev. 45: 409-436). Sin embargo, cualquier método conocido en la técnica para la introducción de DNA en una célula huésped puede ser usado.

5

[0149] La célula huésped también puede ser una eucariota, tal como una célula de mamífero, insecto, planta, o fúngica.

10

[0150] La célula huésped puede ser una célula fúngica. "Hongos" como se utiliza en este caso incluye los filos Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, y Zygomycota (como se define por Hawksworth et al., en, Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8ª edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK) al igual que los Oomycota (como se cita en Hawksworth et al., 1995, *supra.*, página 171) y todos los hongos mitospóricos (Hawksworth et al., 1995, *supra.*)

15

[0151] La célula huésped fúngica puede ser una célula de levadura. "Levadura" como se utiliza en este caso incluye levadura ascoesporógena (Endomycetales), levadura basidioesporogénea, y levadura de los Fungi Imperfecti (Blastomycetes). Ya que la clasificación de levadura puede cambiar en el futuro, para los fines de esta invención, levadura debe ser definida como se describe en Biology and Activities of Yeast (Skinner, F.A., Passmore, S.M., and Davenport, R.R., eds, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series nº 9, 1980).

20

[0152] La célula huésped de levadura puede ser una célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o *Yarrowia* tal como una célula de *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, *Saccharomyces oviformis*, o *Yarrowia lipolytica*.

25

[0153] La célula huésped fúngica puede ser una célula fúngica filamentosa. "Hongos filamentosos" incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycota y Oomycota (como definido por Hawksworth et al., 1995, *supra.*). Los hongos filamentosos son generalmente caracterizados por una pared micelial compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano, y otros polisacáridos complejos. Crecimiento vegetativo es por alargamiento hifal y el catabolismo de carbono es estrictamente aeróbico. En cambio, el crecimiento vegetativo por levaduras tal como *Saccharomyces cerevisiae* es por el injerto de un talo unicelular y el catabolismo de carbono puede ser fermentativo.

30

35

[0154] La célula huésped fúngica filamentosa puede ser una célula de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trametes*, o *Trichoderma*.

40

[0155] Por ejemplo, la célula huésped fúngica filamentosa puede ser una célula de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis pannocinta*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa*, *Ceriporiopsis subvermisporea*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Coprinus cinereus*, *Coriolus hirsutus*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus eryngii*, *Thielavia terrestris*, *Trametes villosa*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, o *Trichoderma viride*.

45

50

55

[0156] Células fúngicas se pueden transformar por un proceso que implique formación de protoplastos, transformación de protoplastos, y regeneración de la pared celular en cierto modo conocido por se. Procedimientos adecuados para transformación de células huésped de *Aspergillus* y *Trichoderma* son descritas en EP 238023 y Yelton et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1470-1474. Métodos adecuados para transformar las especies de *Fusarium* descritas por Malardier et al., 1989, Gene 78: 147-156, y WO 96/00787. Levadura se puede transformar utilizando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, en Abelson, J.N. y Simon, M.I., editors, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Volumen 194, pp 182-187, Academic Press, Inc., New York; Ito et al., 1983, J. Bacteriol. 153: 163; e Hinnen et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1920.

60

65

Métodos de producción

5 [0157] La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención, que comprende: (a) cultivo de una célula, que en su forma tipo salvaje produce el polipéptido, bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido. En un aspecto preferido, la célula es del género *Kribbella*. En un aspecto más preferido, la célula es *Kribbella solani* o *Kribbella aluminosa*.

10 [0158] La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención, que comprende: (a) cultivo de una célula huésped recombinante de la presente invención bajo las condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.

15 [0159] Las células huésped se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción del polipéptido métodos de utilización bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, la célula se puede cultivar por cultivo en matraz de agitación, y fermentación a escala pequeña o a gran escala (incluidas las fermentaciones continuas, discontinuas, de lote alimentado, o en estado sólido) en los fermentadores de laboratorio o industriales realizados en un medio adecuado y bajo condiciones que permiten al polipéptido expresarse y/o aislarse. El cultivo tiene lugar en un medio nutritivo adecuado comprendiendo fuentes de nitrógeno y carbono y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según composiciones publicadas (por ejemplo, en catálogos de la American Type Culture Collection). Si el polipéptido se segrega en el medio nutritivo, el polipéptido se puede recuperar directamente del medio. Si el polipéptido no es segregado, se puede recuperar de lisatos celulares.

25 [0160] El polipéptido se puede detectar utilizando métodos conocidos en la técnica que son específicos para los polipéptidos. Estos métodos de detección pueden incluir el uso de anticuerpos específicos, formación de un producto enzimático, o desaparición de un sustrato enzimático. Por ejemplo, un ensayo enzimático se puede utilizar para determinar la actividad del polipéptido.

30 [0161] El polipéptido se puede recuperar utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido se puede recuperar del medio nutritivo por procedimientos convencionales que incluyen, pero sin limitarse a, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación, o precipitación.

35 [0162] El polipéptido se puede purificar por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica incluida, pero sin limitarse a, cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, hidrofóbico cromatoenfoco, y exclusión por tamaños), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectroenfoco preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación de sulfato amónico), SDS-PAGE, o extracción (véase, por ejemplo, Protein Purification, J.-C. Janson y Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989) para obtener polipéptidos sustancialmente puros.

40 [0163] En un aspecto alternativo, el polipéptido no es recuperado, sino que preferiblemente una célula huésped de la presente invención que expresa un polipéptido se usa como una fuente del polipéptido.

Plantas

45 [0164] La presente descripción también se refiere a plantas, por ejemplo, una planta transgénica, parte de la planta, o célula vegetal, que incluye un polinucleótido aislado de la presente invención para expresar y producir el polipéptido en cantidades recuperables. El polipéptido se puede recuperar de la planta o parte de la planta. Alternativamente, la planta o parte de la planta con el polipéptido se puede utilizar como tal para mejorar la calidad de un alimento o pienso, por ejemplo, mejorando el valor nutricional, palatabilidad, y propiedades reológicas, o para destruir un factor antinutritivo.

55 [0165] La planta transgénica puede ser dicotiledónea (una dicot) o monocotiledónea (una monocot). Ejemplos de plantas monocot son hierbas, tales como poa de prados (pasto azul, Poa), hierba forrajera tal como Festuca, Lolium, césped templado, tal como Agrostis, y cereales, por ejemplo, trigo, avena, centeno, cebada, arroz, sorgo, y maíz (grano).

60 [0166] Ejemplos de plantas dicotiledóneas son tabaco, legumbres, tales como altramuces, patata, remolacha azucarera, guisante, judía y soja, y plantas crucíferas (familia *Brassicaceae*), tal como coliflor, semilla de colza, y el organismo modelo *Arabidopsis thaliana* relacionado de forma cercana.

65 [0167] Ejemplos de partes de plantas son tallo, callo, hojas, raíz, frutas, semillas, y tubérculos al igual que los tejidos individuales que comprenden estas partes, por ejemplo, epidermis, mesofilo, parénquima, tejidos vasculares, meristemas. Compartimentos de células vegetales específicas, tales como cloroplastos, apoplastos, mitocondria, vacuolas, peroxisomas y citoplasma son también considerados una parte de la planta. Además, cualquier célula vegetal, cualquiera que sea el origen del tejido, se considera una parte de la

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

5 [0168] También dentro del campo de la presente descripción está la progenie de tales plantas, partes de la planta, y células vegetales.

[0169] La planta transgénica o célula vegetal que expresa un polipéptido se puede construir conforme a métodos conocidos en la técnica. En resumen, la planta o célula vegetal se construye por la incorporación de uno o más (varios) constructos de expresión que codifican un polipéptido en el genoma del huésped de la planta o genoma de cloroplasto y propagando la planta modificada resultante o célula vegetal en una planta transgénica o célula vegetal.

10
15 [0170] El constructo de expresión es convenientemente un constructo de ácidos nucleicos que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido operativamente enlazado con secuencias reguladoras apropiadas requeridas para la expresión del polinucleótido en la planta o parte de la planta de elección. Además, el constructo de expresión puede comprender un marcador seleccionable útil para la identificación de células huésped en las que el constructo de expresión ha sido integrado y las secuencias de DNA necesarias para la introducción del constructo en la planta en cuestión (la última depende del método de introducción de DNA para ser usado).

20
25 [0171] La elección de secuencias reguladoras, tales como secuencias del promotor y terminador y opcionalmente secuencias señal o de tránsito, se determina, por ejemplo, basándose en cuándo, dónde, y cómo se desea que el polipéptido sea expresado. Por ejemplo, la expresión del gen que codifica un polipéptido puede ser constitutiva o inducible, o puede estar en fase de desarrollo o ser específica del tejido, y el producto génico puede ser dirigido a un tejido específico o parte de la planta tal como semillas u hojas. Secuencias reguladoras son, por ejemplo, descritas por Tague et al., 1988, *Plant Physiology* 86: 506.

30 [0172] Para expresión constitutiva, el promotor 35S-CaMV, de ubiquitina-1 de maíz, y de actina 1 de arroz se pueden utilizar (Franck et al., 1980, *Cell* 21: 285-294; Christensen et al., 1992, *Plant Mol. Biol.* 18: 675-689; Zhang et al., 1991, *Plant Cell* 3: 1155-1165). Promotores específicos de un órgano pueden ser, por ejemplo, un promotor de tejidos sumidero de almacenamiento tales como semillas, tubérculos de patata, y frutas (Edwards y Coruzzi, 1990, *Ann. Rev. Genet.* 24: 275-303), o de tejidos sumidero metabólicos tales como meristemas (Ito et al., 1994, *Plant Mol. Biol.* 24: 863-878), un promotor específico de la semilla como el promotor de glutelina, prolamina, globulina, o de albúmina de arroz (Wu et al., 1998, *Plant Cell Physiol.* 39: 885-889), un promotor de *Vicia faba* de la legúmina B4 y el gen de proteína de semilla desconocida de *Vicia faba* (Conrad et al., 1998, *J. Plant Physiol.* 152: 708-711), un promotor de una proteína del cuerpo de aceite de semilla (Chen et al., 1998, *Plant Cell Physiol.* 39: 935-941), el promotor *napA* de proteína de almacenamiento de *Brassica napus*, o cualquier otro promotor específico de semilla conocido en la técnica, por ejemplo, como se describe en WO 91/14772. Además, el promotor puede ser un promotor específico de la hoja tal como el promotor *rbcS* de arroz o tomate (Kozuka et al., 1993, *Plant Physiol.* 102: 991-1000), el promotor del gen de adenina metiltransferasa del virus *chlorella* (Mitra y Higgins, 1994, *Plant Mol. Biol.* 26: 85-93), el promotor del gen *aldP* de arroz (Kagaya et al., 1995, *Mol. Genet.* 248: 668-674), o un promotor inducible de herida como el promotor *pin2* de patata (Xu et al., 1993, *Plant Mol. Biol.* 22: 573-588). Asimismo, el promotor puede ser inducible por tratamientos abióticos tales como temperatura, sequía, o alteraciones en la salinidad o inducidas por sustancias aplicadas exógenamente que activan el promotor, por ejemplo, etanol, estrógenos, hormonas vegetales tales como etileno, ácido abscísico, y ácido giberélico, y metales pesados.

40
45
50 [0173] Un elemento intensificador del promotor también se puede usar para conseguir expresión más alta de un polipéptido en la planta. Por ejemplo, el elemento intensificador del promotor puede ser un intrón que es colocado entre el promotor y el polinucleótido que codifica un polipéptido. Por ejemplo, Xu et al., 1993, *supra*, revelan el uso del primer intrón del gen de actina 1 de arroz para mejorar la expresión.

55 [0174] El gen marcador seleccionable y cualquiera de las otras partes del constructo de expresión se pueden elegir de aquellas disponibles en la técnica.

60 [0175] El constructo de ácidos nucleicos se incorpora en el genoma de la planta según técnicas convencionales conocidas en la técnica, incluyendo transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación mediada por virus, microinyección, bombardeo de partículas, transformación biolística, y electroporación (Gasser et al., 1990, *Science* 244: 1293; Potrykus, 1990, *Bio/Technology* 8: 535; Shimamoto et al., 1989, *Nature* 338: 274).

65 [0176] Actualmente, la transferencia de genes mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es el método de elección para generar dicotiledóneas transgénicas (para una revisión, véase Hooykas y Schilperoort, 1992, *Plant Mol. Biol.* 19: 15-38) y también pueden usarse para la transformación de monocotiledóneas, aunque

5 otros métodos de transformación son frecuentemente usados para estas plantas. Actualmente, el método de elección para generar monocotiledóneas transgénicas es bombardeo de partículas (oro microscópico o partículas de tungsteno recubiertas con el DNA transformante) de callos embriogénicos o embriones en desarrollo (Christou, 1992, Plant J. 2: 275-281; Shimamoto, 1994, Curr. Opin. Biotechnol. 5: 158-162; Vasil et al., 1992, Bio/Technology 10: 667-674). Un método alternativo para transformación de monocotiledóneas se basa en transformación de protoplasto como se describe por Omirulleh et al., 1993, Plant Mol. Biol. 21: 415-428. Métodos de transformación adicionales para uso conforme a la presente descripción incluyen aquellas descritas en las patentes estadounidenses Nos. 6,395,966 y 7,151,204.

10 [0177] Después de la transformación, los transformantes que han incorporado el constructo de expresión se seleccionan y regeneran en plantas enteras según métodos bien conocidos en la técnica. Frecuentemente el procedimiento de transformación se diseña para la eliminación selectiva de genes de selección bien durante la regeneración o en las siguientes generaciones usando, por ejemplo, cotransformación con dos constructos de T-DNA separados o escisión específica del sitio del gen de selección por una recombinasa específica.

15 [0178] Además de dirigir la transformación de un genotipo de planta particular con un constructo preparado según la presente invención, las plantas transgénicas pueden ser hechas cruzando una planta que tiene el constructo con una segunda planta que carece del constructo. Por ejemplo, un constructo que codifica un polipéptido se puede introducir en una variedad de plantas particular por cruzamiento, sin la necesidad de transformar siempre directamente una planta de esta variedad dada. Por lo tanto, la presente descripción abarca no solo una planta directamente regenerada de células que han sido transformadas conforme a la presente descripción, sino también la progenie de tales plantas. Como se utiliza en este caso, progenie puede referirse a la descendencia de cualquier generación de una planta progenitora preparada conforme a la presente descripción. Tal progenie puede incluir un constructo de DNA preparado conforme a la presente descripción, o una porción de un constructo de DNA preparado conforme a la presente descripción. El cruzamiento resulta en la introducción de un transgen en una línea de planta por polinización cruzada de una línea de partida con una línea de planta donadora. Ejemplos no limitativos de tales etapas son además articuladas en la patente estadounidense No: 7,151,204.

30 [0179] Plantas se pueden generar a través de un proceso de conversión retrocruzado. Por ejemplo, las plantas incluyen plantas referidas como un genotipo, línea, consanguíneo, o híbrido convertido por retrocruzamiento.

35 [0180] Marcadores genéticos se pueden utilizar para asistir en la introgresión de uno o más transgenes de la invención de un contexto genético en otro. La selección asistida por marcador ofrece ventajas con respecto al cultivo convencional en cuanto a que se puede usar para evitar errores provocados por variaciones fenotípicas. Además, marcadores genéticos pueden proporcionar datos con respecto al grado relativo de germoplasma de élite en la progenie individual de un cruzamiento particular. Por ejemplo, cuando una planta con una característica deseada que de otro modo tiene un contexto genético no deseable agrónomicamente se cruza con un progenitor de élite, marcadores genéticos se pueden utilizar para seleccionar la progenie que no solo posee la característica de interés, sino que también tiene una proporción relativamente grande del germoplasma deseado. De esta manera, el número de generaciones requeridas para la introgresión de uno o más rasgos en un contexto genético particular es minimizado.

45 [0181] La presente descripción también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención que comprende: (a) cultivo de una planta transgénica o una célula vegetal que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.

50 **Composiciones**

[0182] La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden una proteasa de la presente invención. Preferiblemente, las composiciones se enriquecen con tal proteasa. El término "enriquecido" indica que la actividad de proteasa de la composición ha sido aumentada, por ejemplo, con un factor de enriquecimiento de al menos 1.1.

60 [0183] La composición puede comprender una proteasa de la presente invención como el componente enzimático principal, por ejemplo, una composición monocomponente. Alternativamente, la composición puede comprender actividades enzimáticas múltiples, tales como una aminopeptidasa, amilasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celulasa, quitinasa, cutinasa, glicosiltransferasa de ciclodextrina, desoxiribonucleasa, esterasa, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, glucoamilasa, alfa-glucosidasa, beta-glucosidasa, haloperoxidasa, invertasa, lacasa, lipasa, manosidasa, oxidasa, enzima pectinolítica, peptidoglutaminasa, peroxidasa, fitasa, polifenoloxidasa, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa, o xilanasas. La(s) enzima(s) adicional(es) puede(n) ser producida(s), por ejemplo, por microorganismos tales como bacterias u hongos o por plantas o por animales. Las composiciones se pueden preparar conforme a métodos conocidos en la técnica y pueden estar en forma de un líquido o una composición seca. Por

ejemplo, la composición puede estar en la forma de un granulado o un microgranulado. La proteasa se puede estabilizar conforme a métodos conocidos en la técnica.

Usos

5

[0184] La presente invención está también dirigida a métodos para utilizar los polipéptidos que tienen actividad de proteasa, o composiciones de las mismas.

Pienso para animales

10

[0185] La presente invención está también dirigida a métodos para utilizar las proteasas con actividad de proteasa en el pienso para animales, al igual que a suministrar composiciones y aditivos alimenticios comprendiendo las proteasas de la invención.

15

[0186] El término animal incluye todos los animales, incluidos los seres humanos. Ejemplos de animales son no rumiantes, y rumiantes. Animales rumiantes incluyen, por ejemplo, animales tales como oveja, cabras, y ganado bovino, por ejemplo ganado bovino para carne, vacas, y terneros jóvenes. En una forma de realización particular, el animal es un animal no rumiante. Animales no rumiantes incluyen animales monogástricos, por ejemplo cerdos o puercos (incluidos, pero sin limitarse a, lechones, cerdos en crecimiento, y cerdas); aves tales como pavos, patos y pollo (incluidos pero sin limitarse a pollos para asar, ponedoras); caballos (incluidos pero sin limitarse a, de sangre caliente, de sangre fría y mestizos), terneros jóvenes; y pescado (incluido pero sin limitarse a salmón, trucha, tilapia, siluro y carpas; y crustáceos (incluidos pero sin limitarse a langostinos y gambas).

20

25

[0187] El término pienso o composición de pienso significa cualquier compuesto, preparación, mezcla, o composición adecuada para, o destinada para la ingesta por un animal.

30

[0188] En el uso según la invención la proteasa se puede alimentar al animal antes, después, o simultáneamente con la dieta. Lo último es preferido.

35

[0189] En una forma de realización particular, la proteasa, en la forma en la que se añade al pienso, o cuando se incluye en un aditivo de pienso, es bien definida. Bien definido significa que la preparación de proteasa es al menos 50% puro como se determina por cromatografía de exclusión por tamaños (véase ejemplo 12 de WO 01/58275). En otras formas de realización particulares la preparación de proteasa es al menos 60, 70, 80, 85, 88, 90, 92, 94, o al menos 95% pura como se determina por este método.

40

[0190] Una preparación de proteasa bien definida es ventajosa. Por ejemplo, es mucho más fácil administrar la dosis correctamente al pienso de una proteasa que está libre esencialmente de interferir o contaminar otras proteasas. El término administrar la dosis correctamente se refiere en particular al objetivo de obtener los resultados consistentes y constantes, y la capacidad de optimizar la dosificación dependiendo del efecto deseado.

45

[0191] Para el uso en el pienso para animales, sin embargo, la proteasa no necesita ser pura; puede por ejemplo incluir otras enzimas, en cuyo caso podría denominarse una preparación de proteasa.

50

[0192] La preparación de proteasa puede ser (a) añadida directamente al pienso (o usada directamente en un proceso de tratamiento de proteína), o (b) se puede usar en la producción de una o más composiciones intermedias tales como aditivos alimenticios o premezclas que es posteriormente añadida al pienso (o usada en un proceso de tratamiento). El grado de pureza anteriormente descrito se refiere a la pureza de la preparación de proteasa original, si se usa según (a) o (b) arriba.

55

[0193] Las preparaciones de proteasa con purezas de este orden de magnitud son en particular obtenibles usando métodos recombinantes de producción, aunque no se obtienen tan fácilmente y también se someten a una variación entre lotes mucho más alta cuando la proteasa se produce por métodos de fermentación tradicionales.

[0194] Tal preparación de proteasa puede por supuesto mezclarse con otras enzimas.

60

[0195] La proteína puede ser una proteína animal, tal como harina de carne y de huesos, harina de plumas, y/o harina de pescado; o puede ser una proteína vegetal.

65

[0196] El término proteínas vegetales como se utiliza en este caso se refiere a cualquier compuesto, composición, preparación o mezcla que incluye al menos una proteína derivada de u originada de un vegetal, incluidas proteínas modificadas y derivados de proteína. En formas de realización particulares, el contenido de proteína de las proteínas vegetales es al menos 10, 20, 30, 40, 50, o 60% (p/p).

[0197] Proteínas vegetales se pueden derivar de fuentes de proteína vegetal, tales como leguminosas y cereales, por ejemplo materiales de plantas de las familias *Fabaceae* (*Leguminosae*), *Cruciferaeae*, *Chenopodiaceae*, y *Poaceae*, tal como harina de soja, harina de lupino y harina de semilla de colza.

5 [0198] En una forma de realización particular, la fuente de proteína vegetal es material de una o más plantas de la familia *Fabaceae*, por ejemplo soja, altramuz, guisante, o judía.

[0199] En otra forma de realización particular, la fuente de proteína vegetal es material de una o más plantas de la familia *Chenopodiaceae*, por ejemplo remolacha, remolacha azucarera, espinaca o quinoa.

10 [0200] Otros ejemplos de fuentes de proteínas vegetales son semilla de colza, semilla de girasol, semilla de algodón, y repollo.

15 [0201] La soja es una fuente de proteína vegetal preferida.

[0202] Otros ejemplos de fuentes de proteínas vegetales son cereales tales como cebada, trigo, centeno, avena, maíz (grano), arroz, triticale, y sorgo.

20 [0203] En una forma de realización particular de un proceso de tratamiento la proteasa(s) en cuestión está afectando (o actuando en, o ejerciendo su hidrolización o degradando influencia en) las proteínas, tales como proteínas vegetales o fuentes de proteína. Para conseguir esto, la proteína o fuente de proteína es típicamente suspendida en un solvente, por ejemplo un solvente acuoso tal como agua, y los valores de pH y de temperatura son ajustados prestando la debida consideración a las características de la enzima en cuestión. Por ejemplo, el tratamiento puede ocurrir a un valor de pH en el que la actividad de la proteasa real es al menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, o al menos 90%. Asimismo, por ejemplo, el tratamiento puede ocurrir a una temperatura en la que la actividad de la proteasa real es al menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, o al menos 90%. Las indicaciones de porcentaje de actividad anteriores son relativas a las actividades máximas. La reacción enzimática es continuada hasta que el resultado deseado es conseguido, tras lo cual éste puede o no puede ser detenido por inactivación de la enzima, por ejemplo por un paso de tratamiento térmico.

35 [0204] En otra forma de realización particular de un proceso de tratamiento de la invención, la acción de la proteasa es prolongada, lo que significa por ejemplo que la proteasa se añade a las proteínas, pero su influencia de hidrolización por así decirlo no es accionada hasta más tarde cuando se desea, una vez que las condiciones de hidrolización son establecidas, o una vez que cualquier inhibidor enzimático es inactivado, o cualquier otro medio podría haber sido aplicado para posponer la acción de la enzima.

40 [0205] En una forma de realización del tratamiento es un pretratamiento de pienso para animales o proteínas para usar en el pienso para animales, es decir las proteínas son hidrolizadas antes de la ingesta.

45 [0206] El término mejora del valor nutricional de un pienso para animales significa que mejora la disponibilidad de nutrientes en el pienso. En esta invención la mejora de los valores nutricionales se refiere en particular a la mejora de la disponibilidad de la fracción de proteína del pienso, conduciendo así a la extracción de proteína aumentada, rendimientos de proteína más altos, y/o utilización de proteínas mejoradas. Cuando se aumenta el valor nutricional del pienso, la digestibilidad de la proteína y/o del aminoácido aumenta y el índice de crecimiento y/o aumento de peso y/o conversión de pienso (es decir el peso de pienso ingerido con respecto al aumento de peso) del animal puede ser mejorada.

50 [0207] La proteasa se puede añadir al pienso en cualquier forma, sea una proteasa relativamente pura, o en mezcla con otros componentes destinados para la adición al pienso para animales, es decir en forma de aditivos de pienso para animales, tales como las denominadas premezclas para pienso para animales.

55 [0208] En otro aspecto la presente invención se refiere a composiciones para usar en el pienso para animales, tal como pienso para animales, y aditivos de pienso, por ejemplo premezclas.

[0209] Aparte de la proteasa de la invención, los aditivos de pienso para animales de la invención contienen al menos una vitamina liposoluble, y/o al menos una vitamina soluble en agua, y/o al menos un oligoelemento, y/o al menos un macromineral.

60 [0210] Además, ingredientes de aditivos de pienso opcionales, son agentes colorantes, por ejemplo carotenoides tales como beta-caroteno, astaxantina, y luteína; estabilizadores; aditivos de mejora del crecimiento y compuestos/aromatizantes de aroma, por ejemplo creosol, anetol, deca, undeca-y/o dodecalactonas, iononas, irona, gingerol, piperidina, ftálico de propilideno, ftálico de butilideno, capsaicina y/o tanino; péptidos antimicrobianos; ácidos grasos poliinsaturados (PUFA); especies generadoras de oxígeno reactivo; también, un soporte se puede utilizar que puede contener, por ejemplo, 40- 50% en peso de fibras de madera, 8-10% en peso de estearina, 4-5% en peso de polvo de cúrcuma, 4-58% en peso de polvo de

romero, 22- 28% en peso de piedra caliza, 1-3% en peso de una goma, tal como goma arábica, 5-50% en peso de azúcar y/o almidón y 5-15% en peso de agua.

5 [0211] Un pienso o un aditivo de pienso de la invención también puede comprender al menos otra enzima seleccionada de entre fitasa (EC 3.1.3.8 o 3.1.3.26); xilanasas (EC 3.2.1.8); galactanasas (EC 3.2.1.89); alfa-galactosidasa (EC 3.2.1.22); otra proteasa (EC 3.4), fosfolipasa A1 (EC 3.1.1.32); fosfolipasa A2 (EC 3.1.1.4); lisofosfolipasa (EC 3.1.1.5); fosfolipasa C (3.1.4.3); fosfolipasa D (EC 3.1.4.4); amilasa tal como, por ejemplo, alfa-amilasa (EC 3.2.1.1) y/o beta-glucanasa (EC 3.2.1.4 o EC 3.2.1.6).

10 [0212] En una forma de realización particular estas otras enzimas son bien definidas (como se define arriba para preparaciones de proteasa).

15 [0213] Ejemplos de péptidos antimicrobianos (AMP) son CAP18, Leucocina A, Tritrpticina, Protegrina-1, Tanatina, defensina, lactoferrina, lactoferricina, y ovispirina tal como novispirina (Robert Lehrer, 2000), plectasinas, y estatinas, incluidos los compuestos y polipéptidos descritos en WO 03/044049 y WO 03/048148, al igual que variantes o fragmentos de los anteriores que retienen actividad antimicrobiana.

20 [0214] Ejemplos de polipéptidos antifúngicos (AFP) son el *Aspergillus giganteus*, y péptidos de *Aspergillus niger*, al igual que variantes y fragmentos del mismo que retienen actividad antifúngica, como se describe en WO 94/01459 y WO 02/090384.

[0215] Ejemplos de ácidos grasos poliinsaturados son ácidos grasos poliinsaturados C18, C20 y C22, tales como ácido araquidónico, ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentanoico y ácido gamma-linolénico.

25 [0216] Ejemplos de especies generadoras de oxígeno reactivo son productos químicos tales como perborato, persulfato, o percarbonato; y enzimas tales como una oxidasa, una oxigenasa o una sintetasa.

30 [0217] Por lo general vitaminas hidrosolubles y liposolubles, al igual que oligoelementos forman parte de una denominada premezcla destinada a la adición al pienso, mientras que macrominerales son normalmente añadidos separadamente al pienso. Cualquiera de estos tipos de composición, cuando se enriquecen con una proteasa de la invención, es un aditivo de pienso de la invención.

35 [0218] En una forma de realización particular, el aditivo de pienso de la invención se destina a ser incluido (o prescrito como teniendo que ser incluido) en dietas para animales o pienso a niveles de 0,01 a 10,0%; más particularmente 0,05 a 5,0%; o 0,2 a 1,0% (% significa g de aditivo por 100 g pienso). Esto es así en particular para premezclas.

[0219] Las siguientes son listas no exclusivas de ejemplos de estos componentes:

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

45 [0220] Ejemplos de vitaminas hidrosolubles son vitamina B12, biotina y colina, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, niacina, ácido fólico y pantotenato, por ejemplo Ca-D-pantotenato.

[0221] Ejemplos de oligoelementos son manganeso, zinc, hierro, cobre, yodo, selenio, y cobalto.

[0222] Ejemplos de macrominerales son calcio, fósforo y sodio.

50 [0223] Los requisitos nutricionales de estos componentes (ejemplificados con aves y lechones/cerdos) se enumeran en la tabla A de WO 01/58275. Requisito nutricional significa que estos componentes deberían ser proporcionados en la dieta en las concentraciones indicadas.

55 [0224] En la alternativa, el aditivo de pienso de la invención comprende al menos uno de los componentes individuales especificados en la tabla A de WO 01/58275. Al menos uno significa cualquiera de, uno o más de, uno, o dos, o tres, o cuatro etcétera hasta los trece, o hasta los quince componentes individuales. Más específicamente, este al menos un componente individual se incluye en el aditivo de la invención en tal cantidad como para proporcionar una concentración en pienso en la gama indicada en la columna cuatro, o columna cinco, o columna seis de tabla A.

60 [0225] En una otra forma de realización adicional, el aditivo de pienso de la invención comprende al menos una de las vitaminas siguientes, preferiblemente para proporcionar una concentración en pienso en los rangos especificados en la siguiente tabla 1 (para dietas de lechón, y dietas de pollos de engorde, respectivamente).

65

Tabla 1: recomendaciones de vitaminas típicas

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

5 [0226] La presente invención también se refiere a composiciones de pienso para animales. Composiciones de pienso para animales o dietas tienen un contenido relativamente alto de proteína. Aves y dietas de cerdo se pueden caracterizar como se indica en la tabla B de WO 01/58275, columnas 2-3. Dietas de pescado se pueden caracterizar como se indica en la columna 4 de esta tabla B. Además tales dietas de pescado normalmente tienen un contenido de grasa cruda de 200-310 g/kg.

10 [0227] WO 01/58275 corresponde a US 09/779334.

[0228] Una composición de pienso para animales según la invención tiene un contenido bruto de proteína de 50-800 g/kg, y comprende además al menos una proteasa como se reivindica aquí.

15 [0229] Además, o en la alternativa (al contenido bruto de proteína indicado arriba), la composición de pienso para animales de la invención tiene un contenido de energía metabolizable de 10-30 MJ/kg; y/o un contenido de calcio de 0,1-200 g/kg; y/o un contenido de fósforo disponible de 0,1-200 g/kg; y/o un contenido de metionina de 0,1-100 g/kg; y/o un contenido de metionina más cisteína de 0,1-150 g/kg; y/o un contenido de lisina de 0,5-50 g/kg.

20 [0230] En formas de realización particulares, el contenido de energía metabolizable, proteína cruda, calcio, fósforo, metionina, metionina más cisteína, y/o lisina está dentro de cualquiera de los rangos 2, 3,4 o 5 en la tabla B de WO 01/58275 (R. 2-5).

25 [0231] Proteína cruda se calcula como nitrógeno (N) multiplicado por un factor 6,25, es decir proteína cruda (g/kg)= N (g/kg) x 6,25. El contenido de nitrógeno se determina por el método de Kjeldahl (A.O.A.C., 1984, Official Methods of Analysis 14^a ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington DC).

30 [0232] Energía metabolizable se puede calcular basándose en NRC publication Nutrient requirements in swine, novena edición revisada 1988, subcommittee on swine nutrition, committee on animal nutrition, board of agriculture, national research council. National Academy Press, Washington, D.C., pp. 2-6, and the European Table of Energy Values for Poultry Feed-stuffs, Spelderholt centre for poultry research and extension, 7361 DA Beekbergen, The Netherlands. Grafisch bedrijf Ponsen & looijen bv, Wageningen. ISBN 90-71463-12-5.

35 [0233] El contenido dietético de calcio, fósforo disponible y aminoácidos en las dietas para animales completas se calcula basándose en tablas de pienso tal como Veevoedertabel 1997, gegevens over chemische samenstelling, verteerbaarheid en voederwaarde van voedermiddelen, Central Veevoederbureau, Runderweg 6, 8219 pk Lelystad. ISBN 90-72839-13-7.

40 [0234] En una forma de realización particular, la composición de pienso para animales de la invención contiene al menos una proteína vegetal tal como se ha definido anteriormente.

45 [0235] La composición de pienso para animales de la invención también puede contener proteína animal, tal como harina de carne y de huesos, harina de plumas, y/o harina de pescado, típicamente en una cantidad de 0-25%. La composición de pienso para animales de la invención también puede comprender granos de destilería seca con solubles (DDGS), típicamente en cantidades de 0-30%.

50 [0236] En otras formas de realización particulares adicionales, la composición de pienso para animales de la invención contiene 0-80% maíz; y/o 0-80% sorgo; y/o 0-70% trigo; y/o 0-70% cebada; y/o 0-30% avena; y/o 0-40% harina de soja; y/o 0-25% harina de pescado; y/o 0-25% harina de carne y de hueso; y/o 0-20% suero de leche.

[0237] Dietas para animales pueden por ejemplo ser fabricadas como pienso triturado (no granulado) o pienso granulado. Típicamente, los materiales de pienso molidos se mezclan y cantidades suficientes de vitaminas esenciales y minerales se agregan según las especificaciones para las especies en cuestión.

5 Enzimas se pueden adicionar como formulaciones enzimáticas sólidas o líquidas. Por ejemplo, para pienso triturado una formulación sólida o líquida enzimática se puede añadir antes o durante la etapa de mezcla de ingredientes. Para pienso granulado la preparación de proteasa/enzima (líquida o sólida) también se puede añadir antes o durante la etapa de ingredientes del pienso. Típicamente una preparación de proteasa/enzima líquida se añade después del paso de granulación. La enzima también se puede incorporar en un aditivo de

10 pienso o premezcla.

[0238] La concentración enzimática final en la dieta está en la gama de 0,01-200 mg de proteína enzimática por kg dieta, por ejemplo en el rango de 0,5-25 mg proteína enzimática por kg de dieta animal.

15 [0239] La proteasa debería por supuesto aplicarse en una cantidad eficaz, es decir en una cantidad adecuada para mejorar la hidrólisis, digestibilidad, y/o mejora del valor nutricional del pienso. Está actualmente contemplado que la enzima se administra en una o varias de las siguientes cantidades (rangos de dosificación): 0,01-200, 0,01-100, 0,5-100, 1-50, 5-100, 10-100, 0,05-50; o 0,10-10 - todos estos rangos siendo en mg de proteína proteasa por kg de pienso (ppm).

20

[0240] Para determinar mg de proteína proteasa por kg pienso, la proteasa es purificada de la composición de pienso, y la actividad específica de la proteasa purificada es determinada usando un ensayo pertinente (véase bajo actividad proteasa, sustratos, y ensayos). La actividad de proteasa de la composición de pienso como tal se determina también usando el mismo ensayo, y basándose en estas dos determinaciones, la

25 dosificación en mg de proteína proteasa por kg de pienso es calculada.

[0241] Los mismos principios pueden aplicarse para determinar mg de proteína proteasa en aditivos de piensos. Por supuesto, si una muestra está disponible de la proteasa usada para la preparación del aditivo de pienso o el pienso, la actividad específica es determinada de esta muestra (sin necesidad de purificar la proteasa a partir de la composición de pienso o el aditivo).

30

Composiciones de detergente

[0242] La proteasa de la invención se puede adicionar y así volverse un componente de una composición de

35 detergente.

[0243] La composición de detergente de la invención puede por ejemplo ser formulada como una composición de detergente para ropa a mano o a máquina que incluye una composición de aditivo de lavandería adecuada para pretratamiento de tejidos teñidos y una composición de suavizante añadida al enjuague, o ser formulada como una composición de detergente para usar en operaciones de limpieza de superficies duras del hogar en general, o ser formulada para operaciones de lavado de la vajilla a mano o a

40 máquina.

[0244] En un aspecto específico, la invención proporciona un aditivo de detergente que comprende la proteasa de la invención. El aditivo de detergente al igual que la composición de detergente puede comprender una u otras enzimas adicionales tal como otra proteasa, tales como proteasas alcalinas de *Bacillus*, una lipasa, una cutinasa, una amilasa, una carbohidrasa, una celulasa, una pectinasa, una mananasa, una arabinasa, una galactanasa, una xilanasa, una oxidasa, por ejemplo, una lacasa, y/o una peroxidasa.

45

50

[0245] En general las propiedades de la enzima(s) elegida deberían ser compatibles con el detergente seleccionado, (es decir pH óptimo, compatibilidad con otros ingredientes enzimáticos y no enzimáticos, etc.), y la(s) enzima(s) debería(n) estar presente(s) en cantidades eficaces.

55 [0246] Lipasas adecuadas incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico. Mutantes químicamente modificados o creados genéticamente de proteínas están incluidos. Ejemplos de lipasas útiles incluyen lipasas de *Humicola* (sinónimo de *Thermomyces*), por ejemplo de *H. Lanuginosa* (T. Lanuginosus) como se describe en EP 258068 y EP 305216 o de *H. Insolens* como se describe en WO 96/13580, una lipasa de *Pseudomonas*, por ejemplo de *P. alcaligenes* o *P. Pseudoalcaligenes* (EP 218272), *P. cepacia* (EP 331376), *P. stutzeri* (GB 1,372,034), *P. fluorescens*, *Pseudomonas sp.* cepa SD 705 (WO 95/06720 y WO 96/27002), *P. wisconsinensis* (WO 96/12012), una lipasa de *Bacillus*, por ejemplo de *B. subtilis* (Dartois et al. (1993), Biochemica et Biophysica Acta, 1131, 253-360), *B. stearothermophilus* (JP 64/744992) o *B. pumilus* (WO 91/16422). Otros ejemplos son variantes de lipasa tales como los que se describe en WO 92/05249, WO 94/01541, EP 407225, EP 260105, WO 95/35381, WO 96/00292, WO 95/30744, WO 94/25578, WO 95/14783, WO 95/22615, WO 97/04079 y WO 97/07202. Enzimas de lipasa preferidas disponibles

60

65 comercialmente incluyen Lipolase™ y Lipolase Ultra™ (Novozymes A/S). Amilasas adecuadas (alfa y/o beta)

incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico. Mutantes químicamente modificados o creados genéticamente de proteínas están incluidos. Amilasas incluyen, por ejemplo, alfa-amilasas obtenidas de *Bacillus*, por ejemplo una cepa especial de *B. licheniformis*, descrita con más detalle en GB 1,296,839. Ejemplos de amilasas útiles son las variantes descritas en WO 94/02597, WO 94/18314, WO 95/26397, WO 96/23873, WO 97/43424, WO 00/60060, y WO 01/66712, especialmente las variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 15, 23, 105, 106, 124, 128, 133, 154, 156, 181, 188, 190, 197, 202, 208, 209, 243, 264, 304, 305, 391, 408, y 444. Amilasas disponibles comercialmente son Natalase™, Supramyl™, Stainzyme™, Duramyl™, Termamyl™, Fungamyl™ y BAN™ (Novozymes A/S), Rapidase™ y Purastar™ (de Genencor International Inc.).

[0247] Celulasas adecuadas incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico. Mutantes químicamente modificados o creados genéticamente de proteínas están incluidos. Celulasas adecuadas incluyen celulasas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, por ejemplo las celulasas fúngicas producidas de *Humicola insolens*, *Myceliophthora thermophila* y *Fusarium oxysporum* descritas en US 4,435,307, US 5,648,263, US 5,691,178, US 5,776,757 y WO 89/09259. Celulasas especialmente adecuadas son las celulasas alcalinas o neutras que tienen beneficios de cuidado del color. Ejemplos de tales celulasas son celulasas descritas en EP 0 495257, EP 531372, WO 96/11262, WO 96/29397, WO 98/08940. Otros ejemplos son variantes de celulasa tales como las que se describe en WO 94/07998, EP 0 531 315, US 5,457,046, US 5,686,593, US 5,763,254, WO 95/24471, WO 98/12307 y WO 99/01544. Celulasas disponibles comercialmente incluyen Celluzyme™, y Carezyme™ (Novozymes A/S), Clazinase™, y Puradax HA™ (Genencor International Inc.), y KAC-500(B)™ (Kao Corporation).

[0248] Peroxidasas/oxidasas adecuadas incluyen aquellas de origen vegetal, origen bacteriano o fúngico. Mutantes químicamente modificados o creados genéticamente de proteínas están incluidos. Ejemplos de peroxidasas útiles incluyen peroxidasas de *Coprinus*, por ejemplo de *C. cinereus*, y variantes de las mismas como aquellas descritas en WO 93/24618, WO 95/10602, y WO 98/15257. Peroxidasas disponibles comercialmente incluyen Guardzyme™ (Novozymes).

[0249] La(s) enzima(s) detergente(s) se puede(n) incluir en una composición de detergente añadiendo aditivos separados que contienen una o más enzimas, o añadiendo un aditivo combinado que comprende todas estas enzimas. Un aditivo de detergente de la invención, es decir un aditivo separado o un aditivo combinado, se puede formular por ejemplo como un granulado, un líquido, un lodo, etc. Formulaciones de aditivos de detergente preferidos son granulados, en particular granulados no pulverulentos, líquidos, en particular líquidos estabilizados, o lodos.

[0250] Granulados no pulverulentos se pueden producir, por ejemplo, como se describe en US 4,106,991 y 4,661,452 y pueden opcionalmente ser recubiertos por métodos conocidos en la técnica. Ejemplos de materiales de recubrimiento ceroso son productos de óxido de polietileno (polietilenglicol; PEG) con pesos molares medios de 1000 a 20000; nonilfenoles etoxilados teniendo de 16 a 50 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos etoxilados donde el alcohol contiene de 12 a 20 átomos de carbono y en el cual hay 15 a 80 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos; ácidos grasos; y mono- y di- y triglicéridos de ácidos grasos. Ejemplos de materiales de recubrimiento que forman películas adecuadas para aplicación por técnicas de lecho fluidificado se dan en GB 1483591. Preparaciones enzimáticas líquidas pueden, por ejemplo, ser estabilizadas añadiendo un poliol tal como propilenglicol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico o ácido bórico según métodos establecidos. Enzimas protegidas se pueden preparar según el método descrito en EP 238216.

[0251] La composición de detergente de la invención puede estar en cualquier forma conveniente, por ejemplo, una barra, un comprimido, un polvo, un gránulo, una pasta o un líquido. Un detergente líquido puede ser acuoso, típicamente conteniendo hasta 70 % agua y 0-30 % de solvente orgánico, o no acuoso.

[0252] La composición de detergente comprende uno o más surfactantes, que pueden ser no iónicos incluidos semipolares y/o aniónicos y/o catiónicos y/o zwitteriónicos. Los surfactantes están típicamente presentes a un nivel de 0,1 % a 60% en peso.

[0253] Cuando se incluyen en este el detergente normalmente contendrá de aproximadamente 1% a aproximadamente 40% de un surfactante aniónico tal como alquilbencenosulfonato lineal, alfa-olefinsulfonato, alquil sulfato (sulfato de alcohol graso), etoxisulfato alcohólico, alcanosulfonato secundario, éster metílico de ácido alfa-sulfo graso, ácido alquil- o alqueniilsuccínico o jabón.

[0254] Cuando se incluye aquí el detergente normalmente contendrá de aproximadamente 0,2% a aproximadamente 40% de un surfactante no iónico tal como alcohol etoxilato, nonilfenol etoxilato, alquildimethylamino, óxido de alquildimetilamina, monoetanolamida de ácido graso etoxilado, monoetanolamida de ácido graso, amida de ácido polihidroxil alquil graso, o derivados de N-acil N-alquil glucosamina ("glucamidas").

[0255] Cuando se incluye en este el detergente puede contener un hidrótripo, que es un compuesto que solubiliza compuestos hidrofóbicos en soluciones acuosas (u opuestamente, sustancias polares en un ambiente no polar). Típicamente, hidrótripos tienen tanto un carácter hidrofílico e hidrofóbico (propiedades denominadas anfífilicas como se conocen de surfactantes); sin embargo, la estructura molecular de hidrótripos generalmente no favorecen la autoagregación espontánea, véase por ejemplo revisión por Hodgdon y Kaler (2007), Current Opinion in Colloid & Interface Science 12: 121-128. Hidrótripos no muestran una concentración crítica por encima de la cual la autoagregación ocurre como se ha descubierto para surfactantes y lípidos que forman mesofases micelares, laminares u otras mesofases bien definidas. En cambio, muchos hidrótripos muestran un proceso de agregación de tipo continuo donde los tamaños de agregados crecen conforme aumenta la concentración. Sin embargo, muchos hidrótripos alteran el comportamiento de fase, estabilidad, y propiedades coloidales de sistemas que contienen sustancias de carácter polar y no polar, incluyendo mezclas de agua, aceite, surfactantes, y polímeros. Hidrótripos se usan clásicamente a través de industrias de farma, cuidado personal, alimentos, para aplicaciones técnicas. Uso de hidrótripos en composiciones detergentes permiten por ejemplo formulaciones más concentradas de surfactantes (como en el proceso de compactación de detergentes líquidos eliminando el agua) sin fenómenos no deseados de inducción tales como separación de fase o alta viscosidad.

[0256] El detergente puede contener 0-5% en peso, tal como aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5%, o aproximadamente 3% a aproximadamente 5%, de un hidrótripo. Cualquier hidrótripo conocido en la técnica para usar en detergentes puede ser utilizado. Ejemplos no limitativos de hidrótripos incluyen benceno sulfonato de sodio, p-tolueno sulfonato de sodio (STS), xileno sulfonato de sodio (SXS), cumeno sulfonato de sodio (SCS), cimen sulfonato de sodio, óxidos de amina, alcoholes y poliglicoléteres, hidroxinaftoato de sodio, hidroxinaftaleno sulfonato de sodio, etilhexil sulfato de sodio, y combinaciones de los mismos.

[0257] El detergente puede contener 0-65 % de un constructor de detergente o agente complejante tal como zeolita, difosfato, trifosfato, fosfonato, carbonato, citrato, ácido nitrilotriacético, ácido etilenodiaminatetraacético, ácido dietilenotriaminopentaacético, ácido alquil o alqueni succínico, silicatos solubles o silicatos estratificados (por ejemplo SKS-6 de Hoechst).

[0258] El detergente puede comprender uno o más polímeros. Ejemplos son carboximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, polietilenglicol, alcohol polivinílico, poli(vinilpiridina-N-óxido), polivinilimidazol, policarboxilatos tales como poliácrilatos, copolímeros de ácido maléico/acrílico y copolímeros de lauril metacrilato/ácido acrílico.

[0259] El detergente puede contener un sistema blanqueante que puede comprender una fuente de H₂O₂ tal como perborato o percarbonato que se puede combinar con un activador blanqueante de formación de perácido tal como tetraacetiletlenodiamina o nonanoiloxibencenosulfonato. Alternativamente, el sistema blanqueante puede comprender peroxiácidos de por ejemplo tipo amida, imida, o sulfona.

[0260] La(s) enzima(s) de la composición de detergente de la invención se puede estabilizar utilizando agentes estabilizantes convencionales, por ejemplo, un poliol tal como propilenglicol o glicerol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico, ácido bórico, o un derivado de ácido bórico, por ejemplo, un éster de borato aromático, o un derivado de ácido fenil borónico tal como ácido 4-formilfenil borónico, o un péptido aldehído como se describe en por ejemplo WO 10/055052, y la composición se puede formular como se describe en por ejemplo WO 92/19709 y WO 92/19708.

[0261] El detergente también puede contener otros ingredientes de detergentes convencionales tales como por ejemplo acondicionadores de tejidos incluyendo arcillas, potenciadores de espuma, supresores de espuma, agentes anticorrosivos, agentes suspensores de suciedad, agentes antirredeposición de suciedad, tintes, bactericidas, blanqueadores ópticos, hidrótripos, inhibidores de decoloración, o perfumes.

[0262] Es actualmente contemplado que en las composiciones de detergente cualquier enzima, en particular la enzima de la invención, se puede adicionar en una cantidad que corresponde con 0,01-100 mg de proteína enzimática por litro de licor de lavado, preferiblemente 0,05-5 mg de proteína enzimática por litro de licor de lavado, en particular 0,1-1 mg de proteína enzimática por litro de licor de lavado.

[0263] La enzima de la invención puede adicionalmente ser incorporada en las formulaciones detergentes descritas en WO 97/07202.

60 **Constructos de ácidos nucleicos, vectores de expresión, células huésped recombinantes, y métodos para la producción de proteasas**

[0264] La presente invención también se refiere a constructos de ácidos nucleicos, vectores de expresión y células huésped recombinantes que comprenden tales polinucleótidos que codifican las proteasas de la invención.

[0265] La presente invención también se refiere a métodos de producción de una proteasa, que comprende: (a) cultivo de una célula huésped recombinante que comprende tal polinucleótido; y (b) recuperación de la proteína.

5 [0266] La proteína puede ser nativa o heteróloga a una célula huésped. El término "proteína" no pretende aquí referirse a una longitud específica del producto codificado y, por lo tanto, abarca péptidos, oligopéptidos, y proteínas. El término "proteína" también abarca dos o más polipéptidos combinados para formar el producto codificado. Las proteínas también incluyen polipéptidos híbridos y polipéptidos fusionados.

10 [0267] Preferiblemente, la proteína es una hormona o variante de la misma, enzima, receptor o porción de la misma, anticuerpo o porción de la misma, o reportero. Por ejemplo, la proteína puede ser una oxidoreductasa, transferasa, hidrolasa, liasa, isomerasa, o ligasa tal como una aminopeptidasa, amilasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celulasa, quitinasa, cutinasa, ciclodextrina glicosiltransferasa, desoxiribonucleasa, esterasa, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, glucoamilasa, alfa-glucosidasa, beta-glucosidasa, invertasa, lacasa, otra lipasa, manosidasa, mutanasa, oxidasa, enzima pectinolítica, peroxidasa, fitasa, polifenoloxidasas, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa o xilanasas.

[0268] El gen puede ser obtenido de cualquier fuente procarionta, eucariota, u otra fuente.

20 [0269] La presente invención es posteriormente descrita por los ejemplos siguientes que no deberían ser interpretados como limitación del ámbito de la invención.

Ejemplos

25 Materiales y métodos

Ensayos:

Ensayos de proteasa:

30

[0270] 1) Ensayo Suc-AAPF-pNA:
 sustrato pNA: Suc-AAPF-pNA (Bachem L-1400).
 Temperatura: Temperatura ambiente (25°C)
 35 Tampones de ensayo: 100mM de ácido succínico, 100mM HEPES, 100mM CHES, 100mM CABS, 1 mM CaCl₂, 150mM KCl, 0,01% Tritón X-100 ajustado a valores de pH 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, y 11.0 con HCl o NaOH.

40

[0271] 20µl de proteasa (diluida en 0,01% Tritón X-100) fueron mezclados con tampón de ensayo de 100µl. El ensayo fue comenzado añadiendo 100µl de sustrato pNA (50mg disuelto en 1,0ml DMSO y diluido adicionalmente 45x con 0,01% Tritón X-100). El aumento en OD₄₀₅ fue monitoreado como una medida de la actividad de proteasa.

45

2) Ensayo de Protazyma AK:
 Sustrato : comprimido de Protazyma AK (caseína reticulada y teñida; de Megazyme)
 Temperatura : controlada (ensayo temperatura).
 Tampón de ensayo : 100mM ácido succínico, 100mM HEPES, 100mM CHES, 100mM CABS, 1mM CaCl₂, 150mM KCl, 0,01% Tritón X-100, pH 6.5 o pH 7.0.

50

[0272] Un comprimido de Protazyme AK fue suspendido en 2.0ml 0.01% Tritón X-100 por agitación suave. 500µl de esta suspensión y 500µl de tampón de ensayo fueron dispensados en un tubo de Eppendorf y colocados en hielo. 20µl de muestra de proteasa (diluida en 0,01% Tritón X-100) fueron añadidos. El ensayo fue iniciado por transferencia del tubo de Eppendorf a un termomezclador de Eppendorf, que fue ajustado a la temperatura de ensayo. El tubo fue incubado durante 15 minutos en el termomezclador de Eppendorf a su índice de agitación máximo (1400 rpm.). La incubación fue detenida por transferencia del tubo de nuevo al baño de hielo. Luego el tubo fue centrifugado en un centrifugo helado durante unos pocos minutos y 200µl de sobrenadante fueron transferidos a una placa de microtitulación. OD₆₅₀ fue leído como una medida de actividad de proteasa. Un tampón ciego fue incluido en el ensayo (en vez de la enzima).

55

60

3) Ensayo Suc-AAPX-pNA:
 60 Sustratos pNA: Suc-AAPA-pNA (Bachem L-1775)
 Suc-AAPR-pNA (Bachem L-1720)
 Suc-AAPD-pNA (Bachem L-1835)
 Suc-AAPI-pNA (Bachem L-1790)
 Suc-AAPM-pNA (Bachem L-1395)
 65 Suc-AAPV-pNA (Bachem L-1770)
 Suc-AAPL-pNA (Bachem L-1390)

- Suc-AAPE-pNA (Bachem L-1710)
 Suc-AAPK-pNA (Bachem L-1725)
 Suc-AAPF-pNA (Bachem L-1400)
- 5 Temperatura: Temperatura ambiente (25°C)
 Tampón de ensayo: 100mM de ácido succínico, 100mM de HEPES, 100mM de CHES, 100mM de CABS, 1 mM de CaCl₂, 150mM de KCl, 0.01% Tritón X-100, pH 9.0.

10 [0273] 20µl de proteasa (diluida en 0.01% Tritón X-100) fueron mezclados con 100µl de tampón de ensayo. El ensayo fue comenzado añadiendo 100µl de sustrato pNA (50mg disueltos en 1.0ml DMSO y diluidos adicionalmente 45x con 0,01% Tritón X-100). El aumento en OD₄₀₅ fue monitoreado como una medida de la actividad de proteasa.

Ensayo de harina de soja-maíz (ensayo SMM)

15 [0274] Un ensayo de valoración usando harina de soja-maíz como sustrato fue usado para la obtención del perfil de actividad de las proteasas a pH 3-7.

20 [0275] Tampones de ensayo: 100 mM de ácido succínico, 100 mM de HEPES, 100 mM de CHES, 100 mM de CAPS, 1 mM de CaCl₂, 150 mM de KCl, 0.01% Tritón X-100 ajustado utilizando HCl o NaOH a valores de pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 y 11.0 cuando la mezcla 10 ml tampón de ensayo con 1 g de harina de soja-maíz (proporción 30:70). 2 mL de mezcla de harina de soja-maíz se mezclan durante 30 min antes de la adición de proteasa e incubación durante 3 horas a 40°C (500 r.p.m.). Proteasa se añade por 100 µl 100 mM de tampón de acetato sódico (NaAc) (9.565 g/l NaAc, 1.75 g/l de ácido acético, 5 mM CaCl₂, 0.01 % BSA, 0.01 % Tween20, pH 6.0). Sobrenadantes fueron recogidos después de la centrifugación (10 min, 4000 r.p.m., 0°C) y la actividad de proteína es determinada usando un ensayo colorimétrico basado en el método o-ftaldialdehído (OPA) esencialmente según Nielsen et al. (Nielsen, PM, Petersen, D, Dampmann, C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. J Food Sci, 2001, 66: 642-646). Este ensayo detecta grupos de α-amino libre y por lo tanto actividad de proteasa se puede medir como un aumento en la absorbancia. Primeros 500 µl de cada sobrenadante se filtra a través de un filtro de 100 kDa por centrifugación (60 min, 11.000 r.p.m., 5°C). Las muestras son diluidas 10x en agua desionizada y 25 µl de cada muestra se carga en una placa de microtitulación de 96 pocillos (5 réplicas). Finalmente 200 µl de reactivo OPA se dispensan en todos los pocillos y la placa es agitada (10 seg, 750 r.p.m.) y la absorbancia es medida a 340 nm. El nivel de actividad de proteasa se calcula como la diferencia entre absorbancia en la muestra tratada enzimática y la muestra en blanco.

35 Resultados se proporcionan en el ejemplo 4 a continuación

Ensayo de digestión in vitro

40 [0276] Un ensayo de digestión in vitro fue usado para evaluar el efecto de las proteasas en un sustrato de pienso (harina de soja-maíz) en una disposición diseñada para simular la digestión en animales monogástricos. El proceso de incubación consistió en una fase de digestión gástrica con pepsina porcina (SP7000, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU) a pH 3 seguido de una corta incubación duodenal a pH 3.8 y una incubación intestinal pequeña con pancreatina (8xUSB, P-7545, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU) a pH 7.0.

45 La digestión *in vitro* fue realizada utilizando un sistema automatizado basado en un manipulador de líquidos Gilson (Biolab, Dinamarca). Para cada muestra 0,8 g de pienso fue pesado en un tubo y todos los tubos fueron colocados en el manipulador de líquidos (40°C, 500 r.p.m.). Adiciones de soluciones al igual que mediciones de pH fueron realizadas automáticamente. Al tiempo de 0 min, 4.1 mL de HCl (24 mM CaCl₂) se añadió hasta alcanzar pH 3.0 en la solución. Al tiempo de 30 min 0.5 ml de HCl (24 mM CaCl₂, 3000 U pepsina/g de pienso) y 100 µL de un tampón de acetato sódico de 100 mM (258,6 g de NaAc por litro, 0,57 % ácido acético, pH 6.0) fue añadido. Al tiempo de 90 min 900 µL NaOH se añadió hasta alcanzar pH -3.8 y al tiempo de 120 min 400 µL de una solución 1 M NaHCO₃ conteniendo 6,5 mg de pancreatina/g de pienso fue añadida conduciendo a pH 6.8 en la solución. El pH fue medido al tiempo de 30, 60, 90, 115, 120 y 180 min.

50 Las proteasas de prueba fueron añadidas vía el tampón de 100 µl de NaAc al tiempo de 30 min. El nivel de proteína cruda soluble (N x 6.25) medido utilizando un analizador LECO FP-528 de proteína/nitrógeno, fue usado como una indicación de eficacia de proteasa en el ensayo.

60 [0277] Estadística: análisis estadístico de los parámetros registrados fue realizado utilizando un análisis de procedimiento de varianza (ANOVA) y comparación de medias fue hecha utilizando la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$) proporcionada por el procedimiento ANOVA ((SAS, JMP® 5 Administrators Guide to Annually Licensed Windows, Mackintosh, and Linux Versions, Release 5.1. SAS Institute, Cary, NC. (2003)).

65 [0278] Resultados se proporcionan en el ejemplo 5 siguiente.

Cepas

[0279] *Kribbella solani*, aislado O67P2, fue aislada a partir de una muestra de suciedad del Reino Unido obtenida por la Universidad de Warwick en 1990.

- 5 [0280] *Kribbella aluminosa*, aislado O5C3Y, fue aislada a partir de una muestra de China proporcionada a Novozymes en 2009 bajo contrato con Yunnan Institute of Microbiology; Kunming.

Ejemplo 1:

10 Preparación de DNA y secuenciación del genoma de *Kribbella solani* y de *Kribbella aluminosa*

[0281] DNA cromosómico de *Kribbella solani* y *Kribbella aluminosa* fue aislado por QIAamp DNA Blood Mini Kit " (Qiagen, Hilden,, Alemania). 5ug de DNA cromosómico de cada cepa fueron enviados para secuenciación de genoma a FASTERIS SA, Suiza. Los genomas fueron secuenciados por secuenciación de Illumina. Las secuencias del genoma fueron analizadas para proteasas S1 segregadas y las dos proteasas S1 (SEQ ID:1/SEQ ID:2 y SEQ ID: 3/SeqID:4) donde se identificaron.

Expresión de peptidasas S1 de *Kribbella solani* y *Kribbella aluminosa*

20 [0282] Un sistema de vector de integración lineal fue usado para la expresión clonación de dos genes de peptidasa S1 de *Kribbella solani* (SEQ ID N.º: 1) y *Kribbella aluminosa* (SEQ ID N.º: 3), respectivamente. El constructo de integración lineal fue un producto de fusión de PCR hecho por fusión del gen entre dos regiones cromosómicas homólogas de *Bacillus subtilis* junto con un promotor fuerte y un marcador de resistencia al cloranfenicol. La fusión fue hecha por SOE PCR (Horton, R.M., Hunt, H.D., Ho, S.N., Pullen, J.K. and Pease, L.R. (1989) Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes, gene splicing by overlap extension Gene 77: 61-68). El método de SOE PCR es también descrito en la solicitud de patente WO 2003095658. El gen fue expresado bajo control de un sistema de promotor triple (como se describe en WO 99/43835), que consiste en los promotores del gen de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (*amyL*), gen de alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (*amyQ*), y el promotor de *Bacillus thuringiensis cryIIIA* que incluye la secuencia estabilizante. El gen que codifica para cloranfenicol acetiltransferasa fue usado como marcador (descrito en por ejemplo Diderichsen, B.; Poulsen, G.B.; Joergensen, S.T.; A useful cloning vector for *Bacillus subtilis*. Plasmid 30:312 (1993)). Los constructos del gen finales fueron integrados en el cromosoma de *Bacillus* por recombinación homóloga en el locus de peptidato liasa.

35 [0283] Los fragmentos de genes de los dos genes fueron amplificados de DNA cromosómico de las dos cepas con cebadores específicos (KS-directo (SEQ ID NO:9) y KS-inverso (SEQ ID NO:10) para la proteasa S1 de *Kribbella solani* y KA-directo (SEQ ID NO:11) y KA-inverso (SEQ ID NO:12) para la proteasa S1 de *Kribbella aluminosa*. El fragmento flanqueante corriente arriba fue amplificado con los cebadores 260558 (SEQ ID NO:13) e iMB1361Uni2 (SEQ ID NO:14) y el fragmento flanqueante corriente abajo fue amplificado con los cebadores 260559 (SEQ ID NO:15) y oth435 (SEQ ID NO:16) de DNA genómico de la cepa iMB1361 (descrita en la solicitud de patente WO 2003095658).

40 Ambas peptidasas S1 fueron expresadas con una señal de secreción de *Bacillus lentus* (con la siguiente secuencia de aminoácidos: MKKPLGKIVASTALLISVAFSSSIASA (SEQ ID:17) reemplazando las señales de secreción nativas. La señal fue colocada en el fragmento flanqueante corriente arriba. Los cebadores directos fueron diseñados de modo que los genes fueron amplificados desde el sitio de escisión de péptido señal y tuvieron preponderancias de 26 pb y los cebadores inversos contenían una proyección consistente en 24-27 pb (las preponderancias se muestran en *italico* en la tabla siguiente). Estas preponderancias fueron cada una complementaria a parte de uno u otro de los dos fragmentos de vectores lineales y fue usada cuando los fragmentos de gen y los fragmentos de vector fueron ensamblados (descritos a continuación). Todos los cebadores usados se enumeran en la tabla 2 siguiente.

50 Los fragmentos de gen fueron amplificados utilizando una polimerasa de PHUSION™ DNA Polymerase (Finnzymes, Finlandia) según las instrucciones del fabricante. Los dos fragmentos de DNA flanqueantes fueron amplificados con "Expand High Fidelity PCR System" (Roche-Applied-Science) según procedimientos estándar (siguiendo las recomendaciones del fabricante). Las condiciones de PCR fueron de la siguiente manera para el gen S1 de *Kribbella aluminosa*: 98°C durante 30 seg. seguido de 35 ciclos de (98°C durante 10 seg, 54°C durante 20 seg, 72°C durante 1,5 min) y finalización con un ciclo a 72°C durante 10 min. Las condiciones de PCR fueron como sigue para el gen de *Kribbella solani* S1: 98°C durante 30 seg. seguido de 35 ciclos de (98°C durante 10 seg, 72°C durante 20 seg, 72°C durante 45 seg.) y terminando con un ciclo a 72°C durante 10 min. Para ambos constructos de expresión los 3 fragmentos de la PCR fueron sometidos a un empalme posterior por reacción por PCR de extensión de superposición (SOE) para ensamblar los 3 fragmentos en un constructo de vector lineal.

60 Esto fue hecho mediante la mezcla de los 3 fragmentos en proporciones molares iguales y una reacción por PCR nueva fue realizada bajo las condiciones siguientes: inicial 2 min. a 94°C, seguido de 10 ciclos de (94°C durante 15 seg., 55°C durante 45 seg., 68°C durante 5 min.), 10 ciclos de (94°C durante 15 seg., 55°C durante 45 seg., 68°C durante 8 min.), 15 ciclos de (94°C durante 15 seg., 55°C durante 45 seg., 68°C durante 8 min. Además 20 seg. extra por ciclo). Después del primer ciclo los dos cebadores finales 260558 y

260559 fueron añadidos (20pMol de cada uno). Dos µl de cada uno de los productos de PCR fueron transformados en *Bacillus subtilis*. Los transformantes fueron seleccionados en placas LB suplementadas con 6 µg de cloranfenicol por ml.. Dos clones de *Bacillus subtilis* recombinantes cada uno que contiene uno de los constructos de expresión integrados fueron crecidos en cultivos líquidos. Los sobrenadantes que contienen 5 enzimas fueron cosechados y las dos enzimas fueron purificadas como se describe en el ejemplo 2.

Tabla 2. Cebadores usados

Amplificación de	CEBADOR DIRECTO ESPECÍFICO	CEBADOR INVERSO ESPECÍFICO
peptidasa S1 de <i>Kribbella solani</i>	KS DIRECTO (SEQ ID N.º: 9) 5' CTTTTAGTTCATCGATCGCATCGG CT GCACCGGTGAACCCGTCGCG 3'	KS INVERSO (SEQ ID N.º: 10) 5' GGCCAAGGCCGGTTTTTTAT GTTTTA GACGCTGACGCCGTAGCGGG AGAG 3'
peptidasa de <i>Kribbella aluminosa</i> S1	KA directo (SEQ ID N.º: 11) 5'CTTTTAGTTCATCGATCGCATCG GCT GCACCGGTGACCCGTC 3'	KA inverso (SEQ ID N.º: 12) 5' CCAAGGCCGGTTTTTTATGTTT CA GTAGACGCTCACGCCGT 3'
Fragmento flanqueante corriente arriba	260558: (SEQ ID N.º: 13) 5' GAGTATCGCCAGTAAGGGGCG 3'	iMB1361Uni2 (SEQ ID N.º: 14) 5' AGCCGATGCGATCGATGA ACT A 3'
Fragmento flanqueante corriente abajo	OTH435 (SEQ ID N.º: 15) 5' TAAAACATAAAAAACCGGCCTTG GC3'	260559: (SEQ ID N.º: 16) 5' GCAGCCCTAAATCGCATAAA GC 3'

10 **Ejemplo 2:****Purificación de las proteasas**Purificación de la proteasa S1A de *Kribbella solani*

15

[0284] El caldo de cultivo fue centrifugado (20000 x g, 20 min) y el sobrenadante fue cuidadosamente decantado del precipitado. El sobrenadante fue filtrado a través de una unidad de filtración de Nalgene de 0,2µm para eliminar el resto de las células huéspedes de *Bacillus*. El filtrado de 0.2µm fue transferido a 50mM H₃BO₃, 20mM CH₃COOH/NaOH, 1 mM CaCl₂, pH 4.5 en una columna Sephadex G25 (de GE Healthcare). La enzima transferida a Sephadex G25 fue ligeramente turbia y fue filtrada a través de un filtro de microfibras de vidrio GF/A (de Whatman). El filtrado claro se aplicó a una columna FF de SP-sepharosa (de GE Healthcare) equilibrada en 50mM H₃BO₃, 20mM CH₃COOH/NaOH, 1 mM CaCl₂, pH 4.5. Después del lavado de la columna extensamente con el tampón de equilibrado, la proteasa fue eluida con un gradiente de NaCl lineal (0 --> 0.5M) en el mismo tampón sobre cinco volúmenes de columna. Las fracciones de la columna fueron analizadas para actividad de proteasa (utilizando el ensayo Suc-AAPF-pNA a pH 9). El valor máximo de proteasa fue agrupado y el sulfato de amonio sólido se añadió al grupo a una concentración de sulfato de amonio final de 1,8M (NH₄)₂SO₄. El grupo de sulfato de amonio ajustado se aplicó a una (alta sub) columna de Fenil-sepharose FF (de GE Healthcare) equilibrada en 100mM de H₃BO₃, 10mM de MES/NaOH, 2mM de CaCl₂, 1.8M de (NH₄)₂SO₄, pH 6.0. Después del lavado de la columna extensamente con el tampón de equilibrado, la proteasa fue eluida con un gradiente lineal sobre ocho volúmenes de columna entre el tampón de equilibrado y 100mM de H₃BO₃, 10mM de MES/NaOH, 2mM de CaCl₂, pH 6.0 con 25%(v/v) 2-propanol. Fracciones de la columna fueron analizadas para actividad de proteasa (utilizando el ensayo Suc-AAPF-pNA a pH 9). El valor máximo de proteasa fue agrupado y el grupo fue transferido a 50mM H₃BO₃, 20mM CH₃COOH/NaOH, 1mM CaCl₂, pH 4.5 en una columna Sephadex G25 (de GE Healthcare). La enzima transferida a Sephadex G25 fue aplicada a una columna SOURCE S (de GE Healthcare) equilibrada en 50mM de H₃BO₃, 20mM de CH₃COOH/NaOH, 1mM de CaCl₂, pH 4.5. Después del lavado de la columna extensamente con el tampón de equilibrado, la proteasa fue eluida con un gradiente de NaCl lineal (0 --> 0,5M) en el mismo tampón sobre veinte volúmenes de columna. Las fracciones de la columna fueron analizadas para actividad de proteasa (utilizando el ensayo Suc-AAPF-pNA a pH 9) y las fracciones activas fueron analizadas adicionalmente por SDS-PAGE. Las fracciones, donde solo una banda fue vista en el gel de SDS-PAGE teñido de coomassie, fueron agrupadas y transferidas a 100mM de H₃BO₃, 10mM de MES/NaOH, 2mM de CaCl₂, pH 6.0 en una columna Sephadex G25 (de GE Healthcare). La enzima transferida a Sephadex G25 fue la preparación purificada y fue usada para otra caracterización.

45 Purificación de la proteasa S1A de *Kribbella aluminosa*

[0285] El caldo de cultivo fue centrifugado (20000 x g, 20 min) y el sobrenadante fue cuidadosamente decantado desde el precipitado. El sobrenadante fue filtrado a través de una unidad de filtración Nalgene 0.2µm para eliminar el resto de las células huéspedes de Bacillus. El filtrado de 0.2µm fue transferido a 10mM de ácido succínico/NaOH, 1 mM de CaCl₂, pH 5.0 en una columna Sephadex G25 (de GE Healthcare). La enzima transferida a Sephadex G25 fue ligeramente turbia y fue filtrada a través de un filtro de microfibras de vidrio GF/A (de Whatman). El filtrado claro se aplicó a una columna FF de SP-sepharose (de GE Healthcare) equilibrado en 10mM de ácido succínico/NaOH, 1 mM de CaCl₂, pH 5.0. Después del lavado de la columna extensamente con el tampón de equilibrado, la proteasa fue eluida con un gradiente de NaCl lineal (0 --> 0.5M) en el mismo tampón sobre cinco volúmenes de columna. Fracciones de la columna fueron analizadas para actividad de proteasa (utilizando el ensayo Suc-AAPF-pNA a pH 9). El valor máximo de proteasa fue agrupado y sulfato de amonio sólido se añadió al grupo a una concentración de sulfato de amonio final de 1.2M de (NH₄)₂SO₄. El grupo ajustado de sulfato de amonio se aplicó a una columna de Phenyl-Toyopearl (de TosohHaas) equilibrada en 100mM H₃BO₃, 10mM de MES/NaOH, 2mM de CaCl₂, 1.2M de (NH₄)₂SO₄, pH 6.0. Después del lavado de la columna extensamente con el tampón de equilibrado, la proteasa fue eluida con un gradiente lineal de (NH₄)₂SO₄ (1.2 --> 0M) en el mismo tampón sobre cinco volúmenes de columna. Fracciones de la columna fueron analizadas para actividad de proteasa (utilizando el ensayo Suc-AAPF-pNA a pH 9) y fracciones activas fueron además analizadas por SDS-PAGE. Fracciones, donde solo una banda fue vista en el gel de SDS-PAGE teñido de coomassie, fueron agrupadas y el grupo fue transferido a 10mM de ácido succínico/NaOH, 1mM de CaCl₂, pH 5.0 en una columna Sephadex G25 (de GE Healthcare). La enzima transferida a Sephadex G25 fue aplicada a una columna SOURCE S (de GE Healthcare) equilibrada en 10mM de ácido succínico/NaOH, 1 mM de CaCl₂, pH 5.0. Después del lavado de la columna extensamente con el tampón de equilibrado, la proteasa fue eluida por pasos con 10mM de ácido succínico/NaOH, 1 mM de CaCl₂, 0.5M de NaCl, pH 5.0. El valor máximo eluido de la columna fue la preparación purificada y se usó para otra caracterización.

Ejemplo 3:

Caracterización de las proteasas S1A de *Kribbella*

[0286] El ensayo de Suc-AAPF-pNA fue usado para obtener el perfil de actividad de pH y el perfil de estabilidad de pH (actividad residual después de 2 horas a valores de pH indicados). Para el perfil de estabilidad de pH la proteasa fue diluida 10x en los tampones de ensayo diferentes para alcanzar los valores de pH de estos tampones y luego incubados durante 2 horas a 37°C. Tras la incubación, el pH de las incubaciones de proteasa fue transferido al mismo valor de pH, antes del ensayo para actividad residual, por dilución en el tampón de ensayo de pH 9.0. El ensayo de Protazyme AK fue usado para la obtención del perfil de temperatura-actividad a pH 6.5 (*Kribbella solani*) o a pH 7.0 (*Kribbella aluminosa*). El ensayo Suc-AAPX-pNA y diez sustratos diferentes de Suc-AAPX-pNA fueron usados para la obtención de la especificidad P1 de las enzimas a pH 9.0.

[0287] Los resultados se muestran en tablas 3-6 siguientes. Para tabla 3, las actividades son relativas al pH óptimo para las enzimas. Para tabla 4, las actividades son actividades residuales con respecto a una muestra, que fue mantenida a condiciones estables (5°C, pH 9.0). Para tabla 5, las actividades son relativas a la temperatura óptima a pH 6.5 o pH 7.0 para las enzimas. Para tabla 6, las actividades son relativas al mejor sustrato (Suc-AAPF-pNA) para las enzimas.

Tabla 3: perfil de actividad-pH

pH	proteasa S1A de <i>Kribbella solani</i>	proteasa S1A de <i>Kribbella aluminosa</i>	Proteasa 10R
2	0,00	0,00	
3	0,01	0,01	0,00
4	0,04	0,05	0,02
5	0,15	0,19	0,07
6	0,48	0,49	0,21
7	0,74	0,72	0,44
8	0,92	0,93	0,67
9	0,98	1,00	0,88
10	1,00	0,97	1,00
11	0,91	0,90	0,93

Tabla 4: Perfil de estabilidad de pH (actividad residual después de 2 horas a 37°C)

pH	proteasa S1A de <i>Kribbella solani</i>	proteasa S1A de <i>Kribbella aluminosa</i>	Proteasa 10R
2	0,94	0,82	0,78
3	1,00	1,04	1,03

4	0,99	1,00	0,99
5	1,00	1,06	1,00
6	1,02	0,98	1,03
7	0,99	1,00	1,01
8	0,99	0,97	0,98
9	0,91	0,98	0,99
10	0,38	0,97	0,99
11	0,00	0,92	0,86
Después de 2 horas a 5 °C	1,00 (a pH 9)	1,00 (a pH 9)	1,00 (a pH 9)

Tabla 5: perfil de actividad y temperatura a pH 6.5 o pH 7

Temp (°C)	proteasa S1A de <i>Kribbella solani</i> (pH 6.5)	proteasa S1A de <i>Kribbella aluminosa</i> (pH 7)	Proteasa 10R (pH 6.5)
15	0,00	0,01	0,01
25	0,02	0,01	0,02
37	0,04	0,02	0,06
50	0,14	0,11	0,13
60	0,39	0,36	0,35
70	1,00	1,00	0,96
80	0,40	0,98	1,00
90	-	0,20	0,18

5 Tabla 6: especificidad de P1 en 10 sustratos de Suc-AAPX-pNA a pH 9

Suc-AAPX-pNA	proteasa S1A de <i>Kribbella solani</i>	proteasa S1A de <i>Kribbella aluminosa</i>	Proteasa 10R
Suc-AAPA-pNA	0,13	0,15	0,13
Suc-AAPR-pNA	0,15	0,17	0,09
Suc-AAPD-pNA	0,01	0,00	0,00
Suc-AAPI-pNA	0,00	0,00	0,00
Suc-AAPM-pNA	0,35	0,37	0,78
Suc-AAPV-pNA	0,01	0,01	0,01
Suc-AAPL-pNA	0,21	0,19	0,18
Suc-AAPE-pNA	0,00	0,00	0,00
Suc-AAPK-pNA	0,08	0,09	0,08
Suc-AAPF-pNA	1,00	1,00	1,00

Otras características para la proteasa S1A de *Kribbella solani*

- 10 [0288] Inhibidor: PMSF.
 El peso molecular relativo como determinado por SDS-PAGE fue aprox. $M_r = 23\text{kDa}$.
 El peso molecular determinado por análisis de peso molecular intacto fue 18900.5Da.
 La secuencia madura (de datos de MS-EDMAN y secuencia P23BSS) fue como se indica en SEQ ID NO:2:
 El peso molecular calculado de esta secuencia madura fue 18900.5Da.

Otras características para la proteasa S1A de *Kribbella aluminosa*

- 15 [0289] Inhibidor: PMSF.
 El peso molecular relativo como determinado por SDS-PAGE fue aprox. $M_r = 21\text{ kDa}$.
 El peso molecular determinado por análisis de peso molecular intacto fue 19078.1 Da.
 La secuencia madura (de datos de MS-EDMAN y secuencia de P23XDA) fue como se indica en SEQ ID NO:4 El peso molecular calculado de esta secuencia madura fue 19077.7Da.

Ejemplo 4

Actividad de proteasa en el ensayo de harina de soja-maíz (ensayo SMM)

- 25 [0290] Un ensayo de harina de soja-maíz fue usado para describir la actividad de las proteasas en un sustrato pertinente para pienso para animales. Los resultados se muestran en la tabla 7 siguiente. La actividad máxima para cada proteasa se fija en 1,00 y los otros valores se representan como relativos a la actividad máxima. Las proteasas de la invención muestran un pH óptimo inferior en la harina de soja-maíz que 10R y una actividad relativa más alta en la gama de pH fisiológico amplia de 3-7. Esto indica una posibilidad de las proteasas de la invención de hidrolizar una proteína de la dieta en el tracto digestivo entero
- 30

de cerdos y aves. El pH en el tracto gastrointestinal varía de ácido (típicamente pH 2-4) en el estómago de cerdos y proventrículo y molleja de aves a pH 4-6 en el buche de aves y pH 6-7 en el intestino delgado de cerdos y aves.

5 Tabla 7: actividad relativa de proteasa en harina de soja-maíz a pH 3.0, 4.0, 5.0,6.0 y 7.0

pH	proteasa S1A de <i>Kribbella solani</i>	proteasa S1A de <i>Kribbella aluminosa</i>	Proteasa 10R
3.0	0,55	0,41	0,08
4.0	0,47	0,53	0,10
5.0	0,82	0,83	0,24
6.0	1,00	1,00	0,62
7.0	0,76	0,83	1,00

Ejemplo 5

10 Ensayo de digestión in vitro

[0291] Un ensayo de digestión gastro-intestinal simulado fue realizado para evaluar el potencial de proteasas para aumentar la digestibilidad de proteína en animales monogástricos. El efecto de las proteasas fue medido como un aumento en la solubilización de proteínas. Los resultados se muestran en la tabla 8 siguiente. La proteasa S1A de *K. solani* aumentó la cantidad de proteína soluble en las muestras que indicaban hidrólisis de proteínas, sin embargo, no al mismo nivel en cuanto a proteasa 10R. Una explicación lógica para esto es que la incubación de digestión in vitro como se diseña para este estudio incluye 4 horas de incubación a pH 7 y solo 1½ hora de incubación a pH ≤ 6, el área de pH donde la proteasa S1A de *K. Solani* de la invención tiene una ventaja sobre aquella de la proteasa 10R.

20

Tabla 8: el nivel de proteína soluble como porcentaje de proteína total en las muestras de digestión in vitro después del tratamiento con proteasa S1A de *Kribbella solani* o proteasa 10R

Enzima (mg de proteína enzimática/kg pienso)	Proteína Soluble de total (%)	
	Promedio [†]	Desviación típica
Ninguna enzima	93,45 ^b	2,06
proteasa S1A de <i>Kribbella solani</i> (100)	97,64 ^a	1,06
Proteasa 10R (100)	100,64 ^a	1,75

[†]Letras de superíndice diferentes indican diferencias significativas (P<0,05).

25 Ejemplo 6: termoestabilidad

[0292] Una parte alícuota de la muestra de proteína de proteasa (purificada como se describe en el ejemplo 2) es bien desalada o cambiada de tampón en 20 mM de Na-acetato, pH 4.0 utilizando un preempacitado de columna PD-10 o dializada contra 2 x 500 ml 20 mM Na-acetato, pH 4.0 a 4°C en un paso de 2-3h seguido de un paso durante toda la noche. La muestra es 0,45 µm filtrada y diluida con tampón hasta aprox. 2 A280 unidades. El tampón de diálisis se usa como referencia en la calorimetría diferencial de barrido (DSC). Las muestras son desgasificadas usando la succión de vacío y agitación durante aprox. 10 minutos.

[0293] Un escaneado de DSC se realiza en un MicroCal VP-DSC a una tasa de barrido constante de 1.5 °C/min de 20-90 °C. La manipulación de datos es realizada utilizando el software MicroCal Origin (versión 4.10), y la temperatura de desnaturalización, T_d (llamada también la temperatura de fusión, T_m) se define como la temperatura en el ápice del valor máximo en el termograma.

40 Ejemplo 7: estabilidad de vapor

[0294] La actividad residual de la proteasa después del tratamiento con vapor se puede evaluar utilizando el ensayo siguiente.

[0295] En estos experimentos una configuración modificada se usa por la cual el vapor se proporciona a partir de un generador de vapor y se conduce a la caja. Las muestras colocadas en una placa se insertan en la caja a través de un cajón cuando la temperatura ha alcanzado aprox. 93-94°C. Tras la inserción de las muestras la temperatura cae 4 °C. La incubación se realiza durante 30 segundos mientras la temperatura permanece constante aproximadamente a 90°C. Luego la placa es rápidamente quitada de la caja, las muestras colocadas en hielo, resuspendidas y evaluadas con respecto a la actividad de proteasa usando por ejemplo el ensayo Suc-AAPF-pNA u oftaldialdehído (OPA). Cada muestra de enzima es comparada con una muestra similar que no ha sido tratada por vapor para calcular la actividad residual.

50

Ejemplo 8: pruebas de estabilidad de granulación

[0296] La granulación enzimática se realiza en una manera como se describe en la patente de EEUU nº 4,106,991, Ejemplo 1. El granulado obtenido se seca en un lecho fluidizado a un contenido de agua por debajo de 1% y tamizado para obtener un producto con el rango de partículas 250 µm a 850 µm. Finalmente, el producto es recubierto con aceite de palma y carbonato cálcico como se describe en la patente de EEUU nº 4,106,991, ejemplo 22.

[0297] Aproximadamente 50 g de granulado enzimático se premezcla con 10 kg de pienso durante 10 minutos en un mezclador horizontal pequeño. Esta premezcla se mezcla con 90 kg de pienso durante 10 minutos en un mezclador horizontal mayor. Desde el mezclador el pienso se conduce al acondicionador (un mezclador de cascada con inyección de vapor) a razón de aproximadamente 300 kg/hora. El acondicionador calienta el pienso a 95°C (medido en la salida) inyectando vapor. El periodo de permanencia en el acondicionador es 30 segundos. Desde el acondicionador el pienso se conduce hasta una prensa de Simon Heesen equipada con una boquilla horizontal de 3,0x35 mm y se prensa hasta gránulos con una longitud de alrededor de 15 mm. Después de la prensa los gránulos se colocan en un refrigerador de aire y se enfrían durante 15 minutos.

[0298] La actividad de proteasa es medida utilizando el ensayo Suc-AAPF-pNA antes de la granulación y en los gránulos de pienso después de la granulación. La estabilidad de granulación se determina comparando la actividad de proteasa en el pienso granulado con respecto a la actividad en el pienso no granulado.

[0299] La invención descrita y reivindicada aquí no pretende limitarse en su alcance por los aspectos específicos aquí descritos, ya que estos aspectos se destinan como ilustraciones de diferentes aspectos de la invención. Cualquier aspecto equivalente se destina a estar dentro del campo de esta invención. De hecho, varias modificaciones de la invención además de aquellas mostradas y descritas aquí se volverán aparentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción precedente. Tales modificaciones están también destinadas a caer dentro del campo de las reivindicaciones anexas.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0300] <110> Novozymes A/S

<120> POLIPÉPTIDOS CON ACTIVIDAD DE PROTEASA

<130> 11706-EP-EPA

<150> EP 11178201.7

<151> 2011-08-19

<160> 17

<170> versión de PatentIn 3.5

<210> 1

<211> 879

<212> DNA

<213> Kribbella solani

<220> <221> CDS

<222> (1)..(879)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(90)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (316)..(879)

<400> 1

ES 2 641 039 T3

atg	aaa	ctg	tcc	cca	ttc	cgc	cgc	acc	acc	gca	atc	ctg	gcc	gcg	gcc		48
Met	Lys	Leu	Ser	Pro	Phe	Arg	Arg	Thr	Thr	Ala	Ile	Leu	Ala	Ala	Ala		
-105					-100					-95					-90		
ggg	ctt	gcc	gcc	gcc	gga	ctg	ctg	gcg	tcg	caa	gcc	tcg	gcc	gca	ccg		96
Gly	Leu	Ala	Ala	Ala	Gly	Leu	Leu	Ala	Ser	Gln	Ala	Ser	Ala	Ala	Pro		
				-85					-80					-75			
gtg	aac	ccg	tcc	gcg	ctg	tcc	gcc	tcg	gcg	atc	acg	tcg	acg	ctg	agc		144
Val	Asn	Pro	Ser	Ala	Leu	Ser	Ala	Ser	Ala	Ile	Thr	Ser	Thr	Leu	Ser		
			-70						-65					-60			
aag	gac	gcg	acc	atc	ccc	ggt	acg	gcg	tgg	cag	acc	gct	ccg	gac	ggc		192
Lys	Asp	Ala	Thr	Ile	Pro	Gly	Thr	Ala	Trp	Gln	Thr	Ala	Pro	Asp	Gly		
		-55					-50					-45					
cgg	atc	atc	gtg	tcg	tac	gac	gac	acc	gtg	acc	ggc	gcg	aag	ctg	tcc		240
Arg	Ile	Ile	Val	Ser	Tyr	Asp	Asp	Thr	Val	Thr	Gly	Ala	Lys	Leu	Ser		
	-40					-35					-30						
aag	ctg	acc	agt	gtg	acc	aag	cag	ttc	ggc	cag	cgg	atc	acg	ctg	gag		288
Lys	Leu	Thr	Ser	Val	Thr	Lys	Gln	Phe	Gly	Gln	Arg	Ile	Thr	Leu	Glu		
	-25				-20					-15					-10		
aag	atg	aag	ggc	aag	ctg	acc	aag	tac	atc	gcc	ggc	ggc	gac	gcc	atc		336
Lys	Met	Lys	Gly	Lys	Leu	Thr	Lys	Tyr	Ile	Ala	Gly	Gly	Asp	Ala	Ile		
			-5					-1	1				5				
tac	ggc	ggt	cag	tac	cgg	tgc	tcg	ctc	ggc	ttc	aac	gtc	cgc	agc	ggc		384

ES 2 641 039 T3

Tyr Gly Gly Gln Tyr Arg Cys Ser Leu Gly Phe Asn Val Arg Ser Gly
 10 15 20

agc acg tac tac ttc ctg acc gcg ggt cac tgc ggc aac atc gcc tcc 432
 Ser Thr Tyr Tyr Phe Leu Thr Ala Gly His Cys Gly Asn Ile Ala Ser
 25 30 35

agc tgg tac gcg aac tcc gcc aag acc acg ctg ctc ggt acg acg tac 480
 Ser Trp Tyr Ala Asn Ser Ala Lys Thr Thr Leu Leu Gly Thr Thr Tyr
 40 45 50 55

gga tcg agc ttc ccc ggc aac gac tac gcg atc gtg cag tac agc tcc 528
 Gly Ser Ser Phe Pro Gly Asn Asp Tyr Ala Ile Val Gln Tyr Ser Ser
 60 65 70

tcg tac aca aac cac ccc ggc acg gtc gac ctg tac aac ggc tcc tcg 576
 Ser Tyr Thr Asn His Pro Gly Thr Val Asp Leu Tyr Asn Gly Ser Ser
 75 80 85

cag gac atc acg tcc gcc ggc aac gcg act gtt ggt cag gcg gtc aag 624
 Gln Asp Ile Thr Ser Ala Gly Asn Ala Thr Val Gly Gln Ala Val Lys
 90 95 100

cgc agt ggt agc acc acc ggc gtc cac agc ggc agt gtc acc ggg ctg 672
 Arg Ser Gly Ser Thr Thr Gly Val His Ser Gly Ser Val Thr Gly Leu
 105 110 115

aac gcc acc gtg aac tac gcc gaa ggc acc gtc acc ggc ctg atc cgc 720
 Asn Ala Thr Val Asn Tyr Ala Glu Gly Thr Val Thr Gly Leu Ile Arg
 120 125 130 135

acc aac gtc tgc gcc gaa ggc ggc gac tcc ggc ggc gcc ctc ttc gcc 768
 Thr Asn Val Cys Ala Glu Gly Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Phe Ala
 140 145 150

ggc acc gta gcc ctc ggc ctg acc tcc ggc ggc tcc ggc aac tgc tcc 816
 Gly Thr Val Ala Leu Gly Leu Thr Ser Gly Gly Ser Gly Asn Cys Ser
 155 160 165

tcc ggc ggc acc acc tac ttc cag ccc gtc acc gaa gtc ctc tcc cgc 864
 Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Phe Gln Pro Val Thr Glu Val Leu Ser Arg
 170 175 180

tac ggc gtc agc gtc 879
 Tyr Gly Val Ser Val
 185

5 <210> 2
 <211> 293
 <212> PRT
 <213> Kribbella solani

<400> 2
 Met Lys Leu Ser Pro Phe Arg Arg Thr Thr Ala Ile Leu Ala Ala Ala
 -105 -100 -95 -90

Gly Leu Ala Ala Ala Gly Leu Leu Ala Ser Gln Ala Ser Ala Ala Pro
 -85 -80 -75

ES 2 641 039 T3

Val Asn Pro Ser Ala Leu Ser Ala Ser Ala Ile Thr Ser Thr Leu Ser
 -70 -65 -60

Lys Asp Ala Thr Ile Pro Gly Thr Ala Trp Gln Thr Ala Pro Asp Gly
 -55 -50 -45

Arg Ile Ile Val Ser Tyr Asp Asp Thr Val Thr Gly Ala Lys Leu Ser
 -40 -35 -30

Lys Leu Thr Ser Val Thr Lys Gln Phe Gly Gln Arg Ile Thr Leu Glu
 -25 -20 -15 -10

Lys Met Lys Gly Lys Leu Thr Lys Tyr Ile Ala Gly Gly Asp Ala Ile
 -5 -1 1 5

Tyr Gly Gly Gln Tyr Arg Cys Ser Leu Gly Phe Asn Val Arg Ser Gly
 10 15 20

Ser Thr Tyr Tyr Phe Leu Thr Ala Gly His Cys Gly Asn Ile Ala Ser
 25 30 35

Ser Trp Tyr Ala Asn Ser Ala Lys Thr Thr Leu Leu Gly Thr Thr Tyr
 40 45 50 55

Gly Ser Ser Phe Pro Gly Asn Asp Tyr Ala Ile Val Gln Tyr Ser Ser
 60 65 70

Ser Tyr Thr Asn His Pro Gly Thr Val Asp Leu Tyr Asn Gly Ser Ser
 75 80 85

Gln Asp Ile Thr Ser Ala Gly Asn Ala Thr Val Gly Gln Ala Val Lys
 90 95 100

Arg Ser Gly Ser Thr Thr Gly Val His Ser Gly Ser Val Thr Gly Leu
 105 110 115

Asn Ala Thr Val Asn Tyr Ala Glu Gly Thr Val Thr Gly Leu Ile Arg
 120 125 130 135

Thr Asn Val Cys Ala Glu Gly Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Phe Ala
 140 145 150

Gly Thr Val Ala Leu Gly Leu Thr Ser Gly Gly Ser Gly Asn Cys Ser
 155 160 165

Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Phe Gln Pro Val Thr Glu Val Leu Ser Arg
 170 175 180

ES 2 641 039 T3

Tyr Gly Val Ser Val
185

<210> 3
 <211> 882
 <212> DNA
 5 <213> Kribbella aluminosa

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(882)
 10
 <220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(90)
 15
 <220>
 <221> mat_peptide
 <222> (316)..(882)

 <400> 3
 atg aac atg tcc ccg ttc cgc cgt acc ctc gct gtc ctg gcc gcg gcc 48
 Met Asn Met Ser Pro Phe Arg Arg Thr Leu Ala Val Leu Ala Ala Ala
 -105 -100 -95 -90

 ggg ctt gct gcc agc gga ctg ctg gcg acg cag gcc tcg gcc gca ccg 96
 Gly Leu Ala Ala Ser Gly Leu Leu Ala Thr Gln Ala Ser Ala Ala Pro
 -85 -80 -75

 gtc gac ccg tcc acc ctg tcg gcc gcc gcg atc acg tcc acc ctg agc 144
 Val Asp Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ala Ile Thr Ser Thr Leu Ser
 -70 -65 -60

 gag aac gcg acg atc ccc ggt acg gcg tgg gag acc ggc cct gac gcc 192
 Glu Asn Ala Thr Ile Pro Gly Thr Ala Trp Glu Thr Gly Pro Asp Gly
 -55 -50 -45

 cgg atc atc gtg tcg tac gac gag acc gtc acc ggt gcc aag ctg gcg 240
 Arg Ile Ile Val Ser Tyr Asp Glu Thr Val Thr Gly Ala Lys Leu Ala
 -40 -35 -30

 aag ctg acc agc gtg acg aag cag ttc ggc aag cgg atc aag ctc gag 288
 Lys Leu Thr Ser Val Thr Lys Gln Phe Gly Lys Arg Ile Lys Leu Glu
 -25 -20 -15 -10

 aag atg tcc ggc aag ctg acg aag tac atc gcc gcc gcc gac gcc atc 336
 Lys Met Ser Gly Lys Leu Thr Lys Tyr Ile Ala Gly Gly Asp Ala Ile
 -5 -1 1 5

 tac ggc ggg cag tac cgc tgc tcg ctc gcc ttc aac gtg cgc agc gcc 384
 Tyr Gly Gly Gln Tyr Arg Cys Ser Leu Gly Phe Asn Val Arg Ser Gly
 10 15 20

 agc acc tac tac ttc ctg acc gcg gcc cac tgc ggg aac atc gcg tcc 432
 Ser Thr Tyr Tyr Phe Leu Thr Ala Gly His Cys Gly Asn Ile Ala Ser
 25 30 35

 agc tgg tac gcg aac tcc agc aag acc acg ctg ctc gcc acc gtc gcc 480
 Ser Trp Tyr Ala Asn Ser Ser Lys Thr Thr Leu Leu Gly Thr Val Ala
 40 45 50 55
 20

ES 2 641 039 T3

ggt tca agc ttc ccc ggc aac gac tac gcc atc gtc agg tac agc acg 528
 Gly Ser Ser Phe Pro Gly Asn Asp Tyr Ala Ile Val Arg Tyr Ser Thr
 60 65 70
 tcg tac acc aac cac ccg ggc acc gtg aac ctc tac aac ggt tcg tcc 576
 Ser Tyr Thr Asn His Pro Gly Thr Val Asn Leu Tyr Asn Gly Ser Ser
 75 80 85
 cag gac atc acg tcc gcc ggc aac gcc tac gtg ggc cag gcg gtc aag 624
 Gln Asp Ile Thr Ser Ala Gly Asn Ala Tyr Val Gly Gln Ala Val Lys
 90 95 100
 cgc agt ggt agc acg acc ggt gtg cac agc ggc tcg gtc acc gcg acc 672
 Arg Ser Gly Ser Thr Thr Gly Val His Ser Gly Ser Val Thr Ala Thr
 105 110 115
 aac gcc acg gtc aac tac gcc gaa ggc acc gtc acc ggc ctg atc cgc 720
 Asn Ala Thr Val Asn Tyr Ala Glu Gly Thr Val Thr Gly Leu Ile Arg
 120 125 130 135
 acc aca gtc tgc gcc gaa ggc ggc gac tcc ggc ggc gcc ctg ttc gcc 768
 Thr Thr Val Cys Ala Glu Gly Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Phe Ala
 140 145 150
 ggc acc gta gcc ctc ggc ctg acc tcc ggc ggc tcc ggc aac tgc tca 816
 Gly Thr Val Ala Leu Gly Leu Thr Ser Gly Gly Ser Gly Asn Cys Ser
 155 160 165
 tcc ggc ggc acc acc tac ttc cag ccc gtc acc gaa gtc ctc tcc cgc 864
 Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Phe Gln Pro Val Thr Glu Val Leu Ser Arg
 170 175 180
 tac ggc gtg agc gtc tac 882
 Tyr Gly Val Ser Val Tyr
 185

<210> 4
 <211> 294
 5 <212> PRT
 <213> Kribbella aluminosa

<400> 4
 Met Asn Met Ser Pro Phe Arg Arg Thr Leu Ala Val Leu Ala Ala Ala
 -105 -100 -95 -90

Gly Leu Ala Ala Ser Gly Leu Leu Ala Thr Gln Ala Ser Ala Ala Pro
 -85 -80 -75

Val Asp Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ala Ala Ile Thr Ser Thr Leu Ser
 -70 -65 -60

Glu Asn Ala Thr Ile Pro Gly Thr Ala Trp Glu Thr Gly Pro Asp Gly
 -55 -50 -45

Arg Ile Ile Val Ser Tyr Asp Glu Thr Val Thr Gly Ala Lys Leu Ala
 -40 -35 -30

ES 2 641 039 T3

Lys Leu Thr Ser Val Thr Lys Gln Phe Gly Lys Arg Ile Lys Leu Glu
 -25 -20 -15 -10

 Lys Met Ser Gly Lys Leu Thr Lys Tyr Ile Ala Gly Gly Asp Ala Ile
 -5 -1 1 5

 Tyr Gly Gly Gln Tyr Arg Cys Ser Leu Gly Phe Asn Val Arg Ser Gly
 10 15 20

 Ser Thr Tyr Tyr Phe Leu Thr Ala Gly His Cys Gly Asn Ile Ala Ser
 25 30 35

 Ser Trp Tyr Ala Asn Ser Ser Lys Thr Thr Leu Leu Gly Thr Val Ala
 40 45 50 55

 Gly Ser Ser Phe Pro Gly Asn Asp Tyr Ala Ile Val Arg Tyr Ser Thr
 60 65 70

 Ser Tyr Thr Asn His Pro Gly Thr Val Asn Leu Tyr Asn Gly Ser Ser
 75 80 85

 Gln Asp Ile Thr Ser Ala Gly Asn Ala Tyr Val Gly Gln Ala Val Lys
 90 95 100

 Arg Ser Gly Ser Thr Thr Gly Val His Ser Gly Ser Val Thr Ala Thr
 105 110 115

 Asn Ala Thr Val Asn Tyr Ala Glu Gly Thr Val Thr Gly Leu Ile Arg
 120 125 130 135

 Thr Thr Val Cys Ala Glu Gly Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Phe Ala
 140 145 150

 Gly Thr Val Ala Leu Gly Leu Thr Ser Gly Gly Ser Gly Asn Cys Ser
 155 160 165

 Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Phe Gln Pro Val Thr Glu Val Leu Ser Arg
 170 175 180

 Tyr Gly Val Ser Val Tyr
 185

ES 2 641 039 T3

<210> 5
<211> 888
<212> DNA
<213> *Kribbella flavida*

5

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(888)

10

<220>
<221> sig_peptide
<222> (1)..(84)

15

<220>
<221> mat_peptide
<222> (319)..(888)

<400> 5

ES 2 641 039 T3

atg cgt att cgc cgt gcc gtg gcc ctg ctg gca acc gcc ggt ctg gcc Met Arg Ile Arg Arg Ala Val Ala Leu Leu Ala Thr Ala Gly Leu Ala -105 -100 -95	48
acc acc acc gtt cag ctc gca gcc ccg gcc aac gcg gcc ccg ggt ggc Thr Thr Thr Val Gln Leu Ala Ala Pro Ala Asn Ala Ala Pro Gly Gly -90 -85 -80 -75	96
gag gca ccc gcc gtc acc tcg gcg agc agc atc acc gcc acc ctg gcc Glu Ala Pro Ala Val Thr Ser Ala Ser Ser Ile Thr Ala Thr Leu Ala -70 -65 -60	144
aag gag gcg tcg atc ccg ggc acc gcc tgg atg acc gac gag aag tcc Lys Glu Ala Ser Ile Pro Gly Thr Ala Trp Met Thr Asp Glu Lys Ser -55 -50 -45	192
ggc cgc atc atc gtc tcg tac gac gac acc gtg agc ggc ggc aag ttc Gly Arg Ile Ile Val Ser Tyr Asp Asp Thr Val Ser Gly Gly Lys Phe -40 -35 -30	240
gcc gct ctc acc gcc gtc acc aag cgc ttc ggc agc cag gtc gtg ctg Ala Ala Leu Thr Ala Val Thr Lys Arg Phe Gly Ser Gln Val Val Leu -25 -20 -15	288
gag aag ctg ccc ggc gta ctc agc aag cgg atc agc ggc gga cag gcc Glu Lys Leu Pro Gly Val Leu Ser Lys Arg Ile Ser Gly Gly Gln Ala -10 -5 -1 1 5	336
atc tac ggt ggc ggc tac cgc tgc tcg ctc ggc ttc aac gtc cgc gac Ile Tyr Gly Gly Gly Tyr Arg Cys Ser Leu Gly Phe Asn Val Arg Asp 10 15 20	384
agc gcc ggc acc tac tac ttc atc acc gcc ggc cac tgc acc aac tcg Ser Ala Gly Thr Tyr Tyr Phe Ile Thr Ala Gly His Cys Thr Asn Ser 25 30 35	432
gcc agc acc tgg tac gcc aac tcg tcg cag tcc acc gtg ctc ggc acc Ala Ser Thr Trp Tyr Ala Asn Ser Ser Gln Ser Thr Val Leu Gly Thr 40 45 50	480
cgg acc ggc agc agc ttc ccg ggc aac gac tac ggc atc gtc cgg tac Arg Thr Gly Ser Ser Phe Pro Gly Asn Asp Tyr Gly Ile Val Arg Tyr 55 60 65 70	528
agc acg tcg tac acg aac cac ccc ggc aac gtg tac ctc tac aac ggc Ser Thr Ser Tyr Thr Asn His Pro Gly Asn Val Tyr Leu Tyr Asn Gly 75 80 85	576
tcg tac cag gac atc acc acg gcg ggc aac gcg tcc gtc ggc cag gcc	624

ES 2 641 039 T3

Ser Tyr Gln Asp Ile Thr Thr Ala Gly Asn Ala Ser Val Gly Gln Ala
 90 95 100

gtg cgc cgc agc ggc agc acc acc ggt ctg cgc agc ggc tcg gtc acc 672
 Val Arg Arg Ser Gly Ser Thr Thr Gly Leu Arg Ser Gly Ser Val Thr
 105 110 115

ggc gtc aac gcg acg gtg aac tac ccc gag ggc tcc gtc agc ggc ctg 720
 Gly Val Asn Ala Thr Val Asn Tyr Pro Glu Gly Ser Val Ser Gly Leu
 120 125 130

atc cgc acc aac gtc tgc gcc gaa ggc ggc gac tcc ggc ggc tca ctg 768
 Ile Arg Thr Asn Val Cys Ala Glu Gly Gly Asp Ser Gly Gly Ser Leu
 135 140 145 150

ttc gcc ggc tcc acc gcc ctg ggt ctg acc tcc ggc ggc agc ggc aac 816
 Phe Ala Gly Ser Thr Ala Leu Gly Leu Thr Ser Gly Gly Ser Gly Asn
 155 160 165

tgc tcc acc ggc ggc acg acc tac ttc cag ccc gtc atc gag gtc ctc 864
 Cys Ser Thr Gly Gly Thr Thr Tyr Phe Gln Pro Val Ile Glu Val Leu
 170 175 180

aac cgc tac ggc gtc aac gtc tac 888
 Asn Arg Tyr Gly Val Asn Val Tyr
 185 190

5 <210> 6
 <211> 296
 <212> PRT
 <213> Kribbella flavida

<400> 6
 Met Arg Ile Arg Arg Ala Val Ala Leu Leu Ala Thr Ala Gly Leu Ala
 -105 -100 -95

Thr Thr Thr Val Gln Leu Ala Ala Pro Ala Asn Ala Ala Pro Gly Gly
 -90 -85 -80 -75

Glu Ala Pro Ala Val Thr Ser Ala Ser Ser Ile Thr Ala Thr Leu Ala
 -70 -65 -60

Lys Glu Ala Ser Ile Pro Gly Thr Ala Trp Met Thr Asp Glu Lys Ser
 -55 -50 -45

Gly Arg Ile Ile Val Ser Tyr Asp Asp Thr Val Ser Gly Gly Lys Phe
 -40 -35 -30

Ala Ala Leu Thr Ala Val Thr Lys Arg Phe Gly Ser Gln Val Val Leu
 -25 -20 -15

Glu Lys Leu Pro Gly Val Leu Ser Lys Arg Ile Ser Gly Gly Gln Ala
 -10 -5 -1 1 5

ES 2 641 039 T3

Ile Tyr Gly Gly Gly Tyr Arg Cys Ser Leu Gly Phe Asn Val Arg Asp
 10 15 20

Ser Ala Gly Thr Tyr Tyr Phe Ile Thr Ala Gly His Cys Thr Asn Ser
 25 30 35

Ala Ser Thr Trp Tyr Ala Asn Ser Ser Gln Ser Thr Val Leu Gly Thr
 40 45 50

Arg Thr Gly Ser Ser Phe Pro Gly Asn Asp Tyr Gly Ile Val Arg Tyr
 55 60 65 70

Ser Thr Ser Tyr Thr Asn His Pro Gly Asn Val Tyr Leu Tyr Asn Gly
 75 80 85

Ser Tyr Gln Asp Ile Thr Thr Ala Gly Asn Ala Ser Val Gly Gln Ala
 90 95 100

Val Arg Arg Ser Gly Ser Thr Thr Gly Leu Arg Ser Gly Ser Val Thr
 105 110 115

Gly Val Asn Ala Thr Val Asn Tyr Pro Glu Gly Ser Val Ser Gly Leu
 120 125 130

Ile Arg Thr Asn Val Cys Ala Glu Gly Gly Asp Ser Gly Gly Ser Leu
 135 140 145 150

Phe Ala Gly Ser Thr Ala Leu Gly Leu Thr Ser Gly Gly Ser Gly Asn
 155 160 165

Cys Ser Thr Gly Gly Thr Thr Tyr Phe Gln Pro Val Ile Glu Val Leu
 170 175 180

Asn Arg Tyr Gly Val Asn Val Tyr
 185 190

<210> 7
 <211> 1473
 5 <212> DNA
 <213> Nocardiosis sp.

<220>
 <221> CDS
 10 <222> (318)..(1463)

<220>
<221> sig_peptide
<222> (318)..(404)

5 <220>
<221> mat_peptide
<222> (900)..(1463)

<400> 7

ES 2 641 039 T3

acgtttggta cgggtaccg tgtccgcatg tggccagaat gcccccttgc gacagggaac	60
ggattcggtc ggtagcgcac cgactccgac aaccgcgagg tggccgttcg cgtcggccacg	120
ttctgcgacc gtcacgcgac ccatcatcgg gtgacccac cgagctctga atgggtccacc	180
gttctgacgg tctttccctc accaaaacgt gcacctatgg ttaggacggt gtttaccgaa	240
tgtctcggtg aacgacaggg gccggacggt attcggcccc gatccccctg tgatcccccc	300
aggagagtag ggacccc atg cga ccc tcc ccc gtt gtc tcc gcc atc ggt	350
Met Arg Pro Ser Pro Val Val Ser Ala Ile Gly	
-190 -185	
acg gga gcg ctg gcc ttc ggt ctg gcg ctg tcc ggt acc ccg ggt	395
Thr Gly Ala Leu Ala Phe Gly Leu Ala Leu Ser Gly Thr Pro Gly	
-180 -175 -170	
gcc ctc gcg gcc acc gga gcg ctc ccc cag tca ccc acc ccg gag	440
Ala Leu Ala Ala Thr Gly Ala Leu Pro Gln Ser Pro Thr Pro Glu	
-165 -160 -155	
gcc gac gcg gtc tcc atg cag gag gcg ctc cag cgc gac ctc gac	485
Ala Asp Ala Val Ser Met Gln Glu Ala Leu Gln Arg Asp Leu Asp	
-150 -145 -140	
ctg acc tcc gcc gag gcc gag gag ctg ctg gcc gcc cag gac acc	530
Leu Thr Ser Ala Glu Ala Glu Glu Leu Leu Ala Ala Gln Asp Thr	
-135 -130 -125	
gcc ttc gag gtc gac gag gcc gcg gcc gag gcc gcc ggg gac gcc	575
Ala Phe Glu Val Asp Glu Ala Ala Ala Glu Ala Ala Gly Asp Ala	
-120 -115 -110	
tac ggc ggc tcc gtc ttc gac acc gag agc ctg gaa ctg acc gtc ctg	623
Tyr Gly Gly Ser Val Phe Asp Thr Glu Ser Leu Glu Leu Thr Val Leu	
-105 -100 -95	
gtc acc gat gcc gcc gcg gtc gag gcc gtg gag gcc acc ggc gcc ggg	671
Val Thr Asp Ala Ala Ala Val Glu Ala Val Glu Ala Thr Gly Ala Gly	
-90 -85 -80	
acc gag ctg gtc tcc tac ggc atc gac ggt ctc gac gag atc gtc cag	719
Thr Glu Leu Val Ser Tyr Gly Ile Asp Gly Leu Asp Glu Ile Val Gln	
-75 -70 -65	
gag ctc aac gcc gcc gac gcc gtt ccc ggt gtg gtc ggc tgg tac ccg	767
Glu Leu Asn Ala Ala Asp Ala Val Pro Gly Val Val Gly Trp Tyr Pro	
-60 -55 -50 -45	
gac gtg gcg ggt gac acc gtc gtc ctg gag gtc ctg gag ggt tcc gga	815
Asp Val Ala Gly Asp Thr Val Val Leu Glu Val Leu Glu Gly Ser Gly	
-40 -35 -30	
gcc gac gtc agc ggc ctg ctc gcg gac gcc ggc gtg gac gcc tcg gcc	863
Ala Asp Val Ser Gly Leu Leu Ala Asp Ala Gly Val Asp Ala Ser Ala	
-25 -20 -15	
gtc gag gtg acc acg agc gac cag ccc gag ctc tac gcc gac atc atc	911

ES 2 641 039 T3

Val	Glu	Val	Thr	Thr	Ser	Asp	Gln	Pro	Glu	Leu	Tyr	Ala	Asp	Ile	Ile	
		-10					-5				-1	1				
ggt	ggt	ctg	gcc	tac	acc	atg	ggc	ggc	cgc	tgt	tcg	gtc	ggc	ttc	gcg	959
Gly	Gly	Leu	Ala	Tyr	Thr	Met	Gly	Gly	Arg	Cys	Ser	Val	Gly	Phe	Ala	
5					10					15				20		
gcc	acc	aac	gcc	gcc	ggt	cag	ccc	ggg	ttc	gtc	acc	gcc	ggt	cac	tgc	1007
Ala	Thr	Asn	Ala	Ala	Gly	Gln	Pro	Gly	Phe	Val	Thr	Ala	Gly	His	Cys	
			25						30					35		
ggc	cgc	gtg	ggc	acc	cag	gtg	acc	atc	ggc	aac	ggc	agg	ggc	gtc	ttc	1055
Gly	Arg	Val	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Ile	Gly	Asn	Gly	Arg	Gly	Val	Phe	
		40						45					50			
gag	cag	tcc	gtc	ttc	ccc	ggc	aac	gac	gcg	gcc	ttc	gtc	cgc	ggt	acg	1103
Glu	Gln	Ser	Val	Phe	Pro	Gly	Asn	Asp	Ala	Ala	Phe	Val	Arg	Gly	Thr	
		55					60					65				
tcc	aac	ttc	acg	ctg	acc	aac	ctg	gtc	agc	cgc	tac	aac	acc	ggc	ggg	1151
Ser	Asn	Phe	Thr	Leu	Thr	Asn	Leu	Val	Ser	Arg	Tyr	Asn	Thr	Gly	Gly	
	70					75					80					
tac	gcc	acg	gtc	gcc	ggt	cac	aac	cag	gcc	ccc	atc	ggc	tcc	tcc	gtc	1199
Tyr	Ala	Thr	Val	Ala	Gly	His	Asn	Gln	Ala	Pro	Ile	Gly	Ser	Ser	Val	
85					90					95					100	
tgc	cgc	tcc	ggc	tcc	acc	acc	ggt	tgg	cac	tgc	ggc	acc	atc	cag	gcc	1247
Cys	Arg	Ser	Gly	Ser	Thr	Thr	Gly	Trp	His	Cys	Gly	Thr	Ile	Gln	Ala	
				105					110					115		
cgc	ggc	cag	tcg	gtg	agc	tac	ccc	gag	ggc	acc	gtc	acc	aac	atg	acc	1295
Arg	Gly	Gln	Ser	Val	Ser	Tyr	Pro	Glu	Gly	Thr	Val	Thr	Asn	Met	Thr	
			120					125					130			
cgg	acc	acc	gtg	tgc	gcc	gag	ccc	ggc	gac	tcc	ggc	ggc	tcc	tac	atc	1343
Arg	Thr	Thr	Val	Cys	Ala	Glu	Pro	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ile	
		135					140					145				
tcc	ggc	acc	cag	gcc	cag	ggc	gtg	acc	tcc	ggc	ggc	tcc	ggc	aac	tgc	1391
Ser	Gly	Thr	Gln	Ala	Gln	Gly	Val	Thr	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Asn	Cys	
	150					155						160				
cgc	acc	ggc	ggg	acc	acc	ttc	tac	cag	gag	gtc	acc	ccc	atg	gtg	aac	1439
Arg	Thr	Gly	Gly	Thr	Thr	Phe	Tyr	Gln	Glu	Val	Thr	Pro	Met	Val	Asn	
165					170					175					180	
tcc	tgg	ggc	gtc	cgt	ctc	cgg	acc	tgatccccgc								1473
Ser	Trp	Gly	Val	Arg	Leu	Arg	Thr									
				185												
<210>	8															
<211>	382															
<212>	PRT															
5	<213>	Nocardiopsis sp.														
<400>	8															
Met	Arg	Pro	Ser	Pro	Val	Val	Ser	Ala	Ile	Gly	Thr	Gly	Ala	Leu		
					-190										-185	-180

ES 2 641 039 T3

Ala Phe Gly Leu Ala Leu Ser Gly Thr Pro Gly Ala Leu Ala Ala
 -175 -170 -165

Thr Gly Ala Leu Pro Gln Ser Pro Thr Pro Glu Ala Asp Ala Val
 -160 -155 -150

Ser Met Gln Glu Ala Leu Gln Arg Asp Leu Asp Leu Thr Ser Ala
 -145 -140 -135

Glu Ala Glu Glu Leu Leu Ala Ala Gln Asp Thr Ala Phe Glu Val
 -130 -125 -120

Asp Glu Ala Ala Ala Glu Ala Ala Gly Asp Ala Tyr Gly Gly Ser
 -115 -110 -105

Val Phe Asp Thr Glu Ser Leu Glu Leu Thr Val Leu Val Thr Asp Ala
 -100 -95 -90

Ala Ala Val Glu Ala Val Glu Ala Thr Gly Ala Gly Thr Glu Leu Val
 -85 -80 -75

Ser Tyr Gly Ile Asp Gly Leu Asp Glu Ile Val Gln Glu Leu Asn Ala
 -70 -65 -60

Ala Asp Ala Val Pro Gly Val Val Gly Trp Tyr Pro Asp Val Ala Gly
 -55 -50 -45

Asp Thr Val Val Leu Glu Val Leu Glu Gly Ser Gly Ala Asp Val Ser
 -40 -35 -30 -25

Gly Leu Leu Ala Asp Ala Gly Val Asp Ala Ser Ala Val Glu Val Thr
 -20 -15 -10

Thr Ser Asp Gln Pro Glu Leu Tyr Ala Asp Ile Ile Gly Gly Leu Ala
 -5 -1 1 5

Tyr Thr Met Gly Gly Arg Cys Ser Val Gly Phe Ala Ala Thr Asn Ala
 10 15 20

Ala Gly Gln Pro Gly Phe Val Thr Ala Gly His Cys Gly Arg Val Gly
 25 30 35 40

Thr Gln Val Thr Ile Gly Asn Gly Arg Gly Val Phe Glu Gln Ser Val
 45 50 55

Phe Pro Gly Asn Asp Ala Ala Phe Val Arg Gly Thr Ser Asn Phe Thr
 60 65 70

ES 2 641 039 T3

Leu Thr Asn Leu Val Ser Arg Tyr Asn Thr Gly Gly Tyr Ala Thr Val
75 80 85

Ala Gly His Asn Gln Ala Pro Ile Gly Ser Ser Val Cys Arg Ser Gly
90 95 100

Ser Thr Thr Gly Trp His Cys Gly Thr Ile Gln Ala Arg Gly Gln Ser
105 110 115 120

Val Ser Tyr Pro Glu Gly Thr Val Thr Asn Met Thr Arg Thr Thr Val
125 130 135

Cys Ala Glu Pro Gly Asp Ser Gly Gly Ser Tyr Ile Ser Gly Thr Gln
140 145 150

Ala Gln Gly Val Thr Ser Gly Gly Ser Gly Asn Cys Arg Thr Gly Gly
155 160 165

Thr Thr Phe Tyr Gln Glu Val Thr Pro Met Val Asn Ser Trp Gly Val
170 175 180

Arg Leu Arg Thr
185

5 <210> 9
<211> 47
<212> DNA
<213> sintético

10 <220>
<221> cebador
<222> (1)..(47)

<400> 9
cttttagttc atcgatcgca tcggctgcac cggatgaaccc gtccgcg 47

15 <210> 10
<211> 51
<212> DNA
<213> sintético

20 <220>
<221> cebador
<222> (1)..(51)

25 <400> 10
gggccaaggc cggttttta tgttttagac gctgacgccg tagcgggaga g 51

30 <210> 11
<211> 44
<212> DNA
<213> sintético

<220>
 <221> cebador
 <222> (1)..(44)
 5
 <400> 11
 cttttagttc atcgatcgca tcggctgcac cggtcgaccc gtcc 44
 <210> 12
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> sintético
 10
 <220>
 <221> cebador
 <222> (1)..(41)
 15
 <400> 12
 ccaaggccgg tttttatgt ttcagtagac gctcacgccg t 41
 20
 <210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> sintético
 25
 <220>
 <221> cebador
 <222> (1)..(21)
 30
 <400> 13
 gagtatcgcc agtaaggggc g 21
 <210> 14
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> sintético
 35
 <220>
 <221> cebador
 <222> (1)..(22)
 40
 <400> 14
 agccgatgcg atcgatgaac ta 22
 45
 <210> 15
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> sintético
 50
 <220>
 <221> cebador
 <222> (1)..(25)
 55
 <400> 15
 taaacataa aaaaccggcc ttggc 25
 <210> 16
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> sintético
 60
 <220>
 <221> cebador
 <222> (1)..(23)
 65
 <400> 16

ES 2 641 039 T3

gcagccctaa aatgcataa agc 23

<210> 17

<211> 23

5 <212> PRT

<213> Bacillus lentus

<220>

<221> señal

10 <222> (1)..(23)

<400> 17

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

Ser Val Ala Phe Ser Ser Ser
20

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido aislado que tiene actividad de proteasa, seleccionado del grupo que consiste en:
 - (a) un polipéptido con al menos 85% de identidad de secuencia al polipéptido maduro de SEQ ID NO:2 y/o SEQ ID NO:4 y/o
 - (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos 86% identidad de secuencia a la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3.
2. Polipéptido según la reivindicación 1, que comprende o consiste en SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4.
3. Polipéptido según la reivindicación 1, que es un fragmento de bien SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4, donde el fragmento tiene actividad de proteasa.
4. Polipéptido variante que tiene actividad de proteasa y al menos 85% de identidad de secuencia al polipéptido maduro de SEQ ID NO:2 y/o SEQ ID NO:4, que comprende una sustitución, delección, y/o inserción de uno o más (varios) aminoácidos del polipéptido maduro de SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:4.
5. Composición que comprende el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
6. Composición según la reivindicación 5, donde la composición está en forma de un granulado o un microgranulado.
7. Polinucleótido aislado que codifica el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
8. Constructo de ácidos nucleicos o vector de expresión que comprende el polinucleótido según la reivindicación 7 operativamente enlazado a una o más (diferentes) secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en una célula huésped de expresión.
9. Célula huésped de expresión recombinante que comprende un polinucleótido según la reivindicación 7 operativamente enlazada a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido.
10. Método para producir el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende:
 - (a) cultivo de una célula, que en su forma tipo salvaje produce el polipéptido, bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y
 - (b) recuperación del polipéptido.
11. Método para producir el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende:
 - (a) cultivo de una célula huésped según la reivindicación 9 bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y
 - (b) recuperación del polipéptido.
12. Uso de al menos un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en el pienso animal; en los aditivos de pienso para animales; en la preparación de una composición para usar en el pienso para animales; para mejorar el valor nutricional de un pienso para animales; para aumentar la proteína digerible y/o soluble en el pienso para animales; para aumentar el grado de hidrólisis de proteínas en dietas animales; y/o para el tratamiento de proteínas.
13. Método para mejorar el valor nutricional de un pienso para animales, donde al menos un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 se añade al pienso.
14. Aditivo de pienso que comprende al menos un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-4; y al menos una vitamina liposoluble, y/o al menos una vitamina hidrosoluble, y/o al menos un oligoelemento.
15. Aditivo de pienso según la reivindicación 14, que comprende además una o más amilasas, fitasas, xilanasas, galactanasas, alfa-galactosidasas, proteasas, fosfolipasas; beta-glucanasas, o cualquier mezcla de las mismas.
16. Pienso para animales con un contenido bruto de proteína de 50 a 800 g/kg y que comprende al menos un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
17. Método para el tratamiento de proteínas, que comprende el paso de adición de al menos un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 a al menos una proteína o fuente de proteína.
18. Uso de al menos un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en detergentes.
19. Composición de detergente que comprende al menos un polipéptido de las reivindicaciones 1 a 4.

20. Composición de detergente según la reivindicación 19, donde la composición comprende una o varias otras enzimas seleccionadas del grupo que comprende proteasas, amilasas, lipasas, cutinasas, celulasas, endoglucanasas, xiloglucanasas, pectinasas, pectina liasas, xantanasas, peroxidadas, haloperoxigenasas, catalasas y mananasas, o cualquier mezcla de las mismas.
- 5