

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 007**

51 Int. Cl.:

C12N 9/52 (2006.01)

A23K 20/189 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.01.2013 PCT/EP2013/051448**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.08.2013 WO13110766**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2013 E 13701448 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017 EP 2807254**

54 Título: **Uso de polipéptidos con actividad de proteasa en piensos para animales y en detergentes**

30 Prioridad:

26.01.2012 EP 12152669

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

27.11.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 644 007 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

Uso de polipéptidos con actividad de proteasa en piensos para animales y en detergentes

5 **Referencia a un listado de secuencias**

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

10 **Antecedentes de la invención**10 **Campo de la invención**

[0002] La presente invención se refiere al uso de polipéptidos aislados con actividad de proteasa en piensos para animales y en detergentes. También se refiere al uso de secuencias aisladas de ácidos nucleicos que codifican las proteasas en la producción recombinante de polipéptidos aislados con 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, incluyendo células vegetales y animales, que comprenden las secuencias de ácidos nucleicos, así como métodos para producir y usar las proteasas, en particular el uso de proteasas en piensos animales y detergentes.

20 **Descripción de la técnica relacionada**

[0003] Las proteasas del grupo S1 y aisladas de *Saccharopolyspora* son conocidas en la técnica. Una proteasa de *Saccharopolyspora erythraea* fue divulgada por Oliynyk et al., 2007 en "Complete genome sequence of the erythromycin-producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea* NRRL23338", Nat. Biotechnol. 25: 447-453. La secuencia genómica completa se envió al EMBL/GenBank bajo el número de acceso AM420293. La secuencia de aminoácidos (uniprot: A4FNQ0) es idéntica a la secuencia de SEQ ID NO: 2 (en el presente documento) y la secuencia de aminoácidos madura se describe en SEQ ID NO: 5.

[0004] Otras proteasas S1 se describen en la técnica anterior, tales como la proteasa (Uniprot: C7MV18, SEQ ID NO: 9) descrita por Pati et al., 2009, en "Complete genome sequence of *Saccharomonospora viridis* type strain (P101T)", Stand. Genomic Sci., 1: 141-149 que tiene una identidad de secuencia del 80,7 % con SEQ ID NO: 5. Yum et al. han descrito una proteasa (Uniprot: Q55353, SEQ ID NO: 10) en "Purification and characterization of alkaline serine protease from an alkalophilic *Streptomyces* sp.", Biosci Biotechnol. Biochem., 58: 470 - 474 (1994) que tiene una identidad de secuencia del 70,4 % con SEQ ID NO: 5.

[0005] Lucas et al han enviado una proteasa de *Saccharomonospora xinjiangensis* XJ-54 que tiene un 79,6 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5 a EMBL/GenBank (Uniprot: 10V8H8, SEQ ID NO: 11) y otra proteasa de *Saccharomonospora cyanea* NA - 134 que tiene un 79,0 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5 a EMBL/GenBank (Uniprot: H5XE4, SEQ ID NO: 12). Una proteasa adicional de *Saccharomonospora paurometabolica* YIM 90007 que tiene un 76,1 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5 se ha enviado a EMBL/GenBank (Uniprot: G4J6Q2, SEQ ID NO: 13).

[0006] En la bibliografía de patentes, una proteasa de *Streptomyces* sp., que es idéntica a Uniprot: Q55353 (SEQ ID NO: 10 en el presente documento), se describió en WO 2005/052146 (SEQ ID NO: 649, Genesep: AEA48820) y se describió otra proteasa en WO 2005/052161 (SEQ ID NO: 649, Genesep: AEA80317) ambas con identidad de secuencia del 70,4 % con SEQ ID NO: 5 para uso en piensos para animales y composiciones detergentes. Otras proteasas conocidas tienen identidades de secuencia que son aproximadamente del 70 % o inferiores.

[0007] Es conocido el uso de proteasas en piensos para animales con el fin de mejorar la digestión de las proteínas del pienso. WO 2009/058679 y US 2009/0111161 relativas a una proteasa de *Streptomyces* (*Streptomyces* 1AG3) que tiene una identidad con la proteasa indicada de SEQ ID NO: 2 del 66 %, mencionan el uso de la proteasa en piensos para animales. WO 95/28850 describe la combinación de una fitasa y una o más enzimas proteolíticas microbianas para mejorar la solubilidad de proteínas vegetales. WO 01/58275 describe el uso de proteasas de la familia de las subtilisinas estables frente a los ácidos en los piensos para animales. WO 01/58276 describe el uso en piensos para animales de proteasas estables frente a los ácidos relacionadas con la proteasa derivada de *Nocardopsis* sp. NRRL 18262 (la proteasa 10R), así como con una proteasa derivada de *Nocardopsis alba* DSM 14010. WO 04/072221, WO 04/111220, WO 04/111223, WO 05/035747, y WO 05/123911 describen proteasas relacionadas con la proteasa 10R y su uso en piensos para animales. Además, WO 04/072279 describe el uso de otras proteasas en piensos para animales.

[0008] WO 04/034776 describe el uso de una subtilisina/queratinasa, PWD - 1 de *B. licheniformis* en piensos para aves de corral. WO 04/077960 describe un método para aumentar la digestibilidad de forraje o grano en ruminantes mediante la aplicación de una proteasa bacteriana o fúngica.

[0009] Los productos comerciales que comprenden una proteasa y que se comercializan para su uso en piensos incluyen RONOZYME® ProAct (DSM NP/Novozymes), Axtra® (Danisco), Avizyme® (Danisco), Porzyme® (Danisco), Allzyme™ (Alltech), Versazyme® BioResources, Int.), Poultrygrow™ (Jefo) y Cibenza® DP100 (Novus).

Resumen de la invención

Antecedentes de la invención

[0010] En el uso de proteasas en piensos para animales (*in vivo*), y/o el uso de tales proteasas para el tratamiento de proteínas vegetales (*in vitro*) se observa que las proteínas son factores nutritivos esenciales para animales y seres humanos. La mayoría del ganado y muchos seres humanos consiguen las proteínas necesarias de las fuentes vegetales de proteínas. Fuentes importantes de proteínas vegetales son, p. ej., semillas oleaginosas, legumbres y cereales.

[0011] Por ejemplo, cuando la harina de soja se incluye en piensos para animales monogástricos tales como cerdos y aves de corral, una proporción significativa de los sólidos de harina de soja no se digiere de manera eficiente (la digestibilidad ileal aparente de proteínas en lechones, cerdos en crecimiento y aves de corral tales como pollos de engorde, gallinas ponedoras y gallos es sólo de alrededor del 80%).

[0012] El tracto gastrointestinal de los animales consiste en una serie de segmentos que representan cada uno diferentes entornos de pH. En animales monogástricos tales como cerdos y aves de corral y muchos peces el estómago presenta un pH altamente ácido que puede llegar a pH 1-2, mientras que el intestino presenta un pH más neutro, en el entorno de pH 6-7. Las aves de corral, además del estómago y el intestino, también tienen un buche que precede al estómago, el pH en el buche depende principalmente del alimento ingerido y, por lo tanto, se encuentra típicamente en el rango de pH 4-6. La digestión de proteínas realizada por una proteasa puede ocurrir a lo largo de todo el tracto digestivo, dado que la proteasa está activa y sobrevive a las condiciones en el mismo. Por lo tanto, son especialmente deseables las proteasas altamente estables frente a ácidos para la supervivencia en el ambiente gástrico y que al mismo tiempo son eficazmente activas en un amplio pH fisiológico del animal diana.

[0013] Además, los piensos para animales se formulan a menudo como gránulos, donde se aplica vapor en el proceso de formación de gránulos. Por lo tanto, es deseable también que las proteasas usadas en los piensos para animales sean capaces de permanecer activas después de la exposición al tratamiento con vapor.

[0014] Las proteasas también se han usado durante muchos años en composiciones detergentes para hidrolizar materiales proteínicos sobre textiles, superficies duras y otras superficies, tales como la piel, etc. Dichas composiciones detergentes pueden utilizarse para la limpieza de textiles, en el lavado de manos o en máquinas automáticas mediante polvos, pastillas o barras de jabón, y en el lavado de platos a mano o a máquina como polvos y pastillas.

[0015] Las nuevas variantes de proteasa S1 de la invención son también útiles para estos propósitos.

[0016] Con el fin de producir una proteasa para uso industrial, es importante que la proteasa se produzca con altos rendimientos haciendo que el producto esté disponible en cantidades suficientes para poder proporcionar la proteasa a un precio beneficioso.

[0017] La presente invención se refiere al uso en piensos para animales y detergentes, de polipéptidos aislados que tienen actividad de proteasa seleccionados del grupo que se compone de:

- (a) un polipéptido que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5;
- (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta o condiciones astringencia muy alta con:

- (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 1;
- (ii) la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 3;
- (iii) la cadena complementaria completa de (i) o (ii);

- (c) un polipéptido codificado por un polinucleótido que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3;

- (d) una variante que comprende una sustitución, delección y/o inserción de uno o más (varios) aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; y

- (e) un fragmento de un polipéptido de (a), (b), (c) o (d), que tiene actividad proteasa.

[0018] La presente invención también se refiere a variantes de polipéptidos que tienen actividad de proteasa y que tienen al menos un 85 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5 que comprenden al menos una sustitución, delección y/o inserción de al menos uno o más (varios) aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o

secuencias homólogas.

[0019] 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 de producción recombinante de los polipéptidos.

[0020] La presente invención también se refiere a métodos para preparar una composición para uso en piensos para animales, para mejorar el valor nutricional de un pienso para animales, y a métodos para tratar proteínas que se van a usar en composiciones de piensos para animales.

[0021] Además, la presente invención se refiere también a composiciones detergentes que comprenden las proteasas.

Breve descripción de las figuras

[0022] En las figuras:

La Fig. 1 muestra el perfil de actividad de pH en el sustrato Suc-AAPF-pNA para la proteasa S1 de *Saccharomonospora erythraea* en comparación con la proteasa 10R,

La Fig. 2 muestra el perfil de estabilidad de pH (actividad residual después de 2 horas a 37°C) para la S1 Proteasa 1 de *Saccharomonospora erythraea* en comparación con la proteasa 10R,

La Fig. 3 muestra el perfil de actividad de temperatura en Protazyme AK a pH 7,0 para la proteasa 1 S1 de *Saccharomonospora erythraea* en comparación con la proteasa 10R,

La Fig. 4 muestra la especificidad P1 en 10 sustratos Suc-AAPF-pNA a pH 9,0 para la proteasa S1 de *Saccharomonospora erythraea* en comparación con la proteasa 10R.

La Fig. 5 muestra la actividad de pH en la harina de soja y maíz a pH 3,0, 4,0, 5,0, 6,0 y 7,0 (40°C) para la proteasa 1 S1 a partir de *Saccharomonospora erythraea* en comparación con la proteasa 10R.

Visión general del listado de secuencias

[0023]

SEQ ID NO: 1 es la secuencia de ADN aislada de *Saccharopolyspora erythraea*.

SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos deducida de SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 3 es una secuencia de ADN sintético usada para la producción recombinante de la proteasa S1 de *Saccharopolyspora erythraea*.

SEQ ID NO: 4 es la secuencia de aminoácidos deducida de SEQ ID NO: 3.

SEQ ID NO: 5 es la secuencia de aminoácidos de la proteasa 1 S1 madura de *Saccharopolyspora erythraea*.

SEQ ID NO: 6 es una señal de secreción de *Bacillus lentus*.

SEQ ID NO: 7 es la secuencia de ADN 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 la secuencia de aminoácidos de una serina proteasa de *Saccharomonospora viridis* (UNIPROT: C7MV18).

SEQ ID NO: 10 es la secuencia de aminoácidos de una serina proteasa de *Streptomyces sp.* (UNIPROT: Q55353).

SEQ ID NO: 11 es la secuencia de aminoácidos de una serina proteasa de *Saccharomonospora xinjiangensis* XJ-54 (UNIPROT: 10V8H8).

SEQ ID NO: 12 es la secuencia de aminoácidos de una serina proteasa de *Saccharomonospora cyanea* NA-134 (UNIPROT: H5XEH4).

SEQ ID NO: 13 es la secuencia de aminoácidos de una serina proteasa de *Saccharomonospora paurometabolica* YIM 90007 (UNIPROT: G4J6Q2).

Matriz de Identidad de secuencias

	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO: 2	100	95,2	100	48,5	63,2	56,5	61,1	62,6	63,4
SEQ ID NO: 4	95,2	100	100	47,7	61,5	55,5	60,4	61,5	61,2
SEQ ID NO: 5	100	100	100	58,3	80,7	70,4	79,6	79,0	76,1
SEQ ID NO: 8	48,5	47,7	58,3	100	50,0	50,8	49,7	51,2	48,5
SEQ ID NO: 9	63,2	61,5	80,7	50,0	100	54,9	73,8	73,3	70,1

SEQ ID NO: 10	56,5	55,5	70,4	50,8	54,9	100	56,1	55,0	54,4
SEQ ID NO: 11	61,1	60,4	79,6	49,7	73,8	56,1	100	89,4	73,1
SEQ ID NO: 12	62,6	61,5	79,0	51,2	73,3	55,0	89,4	100	72,5
SEQ ID NO: 13	63,4	61,2	76,1	48,5	70,1	54,4	73,1	72,5	100

Definiciones

5 **[0024] Polipéptidos que tienen actividad de proteasa:** Los polipéptidos que tienen actividad de proteasa, o proteasas, se denominan también a veces peptidasas, proteinasas, péptido hidrolasas o enzimas proteolíticas. Las proteasas pueden ser exoproteasas, que hidrolizan péptidos comenzando en cualquiera de sus extremos, o endoproteasas, que actúan internamente en cadenas polipeptídicas (endopeptidasas). Las endopeptidasas muestran actividad sobre sustratos peptídicos bloqueados en el N-terminal N y el C-terminal que son relevantes para la especificidad de la proteasa en cuestión.

10 **[0025]** El término "proteasa" se define en este documento como una enzima que hidroliza enlaces peptídicos. Esta definición de proteasa también se aplica a la parte de proteasa de los términos "proteasa progenitora" y "variante de proteasa", tal como se usa en el presente documento. El término "proteasa" incluye cualquier enzima que pertenece al grupo enzimático EC 3.4 (incluyendo cada una de las trece subclases del mismo). El número EC se refiere a Nomenclatura de Enzimas 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 complementa y actualiza periódicamente; véase, por ejemplo, la World Wide Web (WWW) en <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/index.html>.

20 **[0026]** La presente invención permite el uso de polipéptidos que tienen actividad de proteasa en piensos para animales y composiciones detergentes. También proporciona polipéptidos que tienen actividad de proteasa y polinucleótidos que codifican los polipéptidos. Las proteasas de la invención son serina proteasas de la familia de peptidasas S1. Las proteasas de la invención muestran sorprendentes propiedades de pH, especialmente propiedades de estabilidad de pH que las convierten en interesantes candidatos para su uso en piensos para animales. Por lo tanto, las proteasas de la invención están activas en Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA dentro de un amplio rango de pH 4-11 y demuestran una actividad especialmente alta en el rango de pH 6-11, están activas en un sustrato de harina de soja y de maíz relevante para los piensos dentro de un rango de pH fisiológico amplio de pH 3-7 y conservan más del 80 % de actividad después de haber sido sometidos durante 2 horas a un pH que puede bajar hasta 2.

30 **[0027]** Las proteasas de la invención y para usar de acuerdo con la invención se seleccionan del grupo que se compone de:

35 (a) proteasas pertenecientes al grupo enzimático EC 3.4.21; y/o
(b) serina proteasas de la familia de las peptidasas S1; tal como se describe en Biochem.J. 290: 205 - 218 (1993) y en la base de datos de proteasa MEROPS, divulgación, 9.4 (31 de enero de 2011) (www.merops.ac.uk). La base de datos se describe en Rawlings, N.D., Barrett, A.J. & Bateman, A. (2010) "MEROPS: the peptidase database", Nucleic Acids Res 38, D227-D233.

40 **[0028]** Las proteasas de la invención son endopeptidasas (EC 3.4.21). Existen varios tipos de actividad de proteasa: Los tres tipos principales de actividad son: tipo tripsina donde hay escisión de sustratos de amida después de Arg o Lys en P1, tipo quimotripsina donde la escisión se produce después de uno de los aminoácidos hidrófobos en P1 y tipo elastasa con escisión después de una Ala en P1.

45 **[0029]** Los polipéptidos de la presente invención tienen al menos un 20 %, por ejemplo, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % y al menos el 100% de la actividad de proteasa de SEQ ID NO: 5 o el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4.

50 **[0030]** Más específicamente, las proteasas usadas en la invención son aquellas que prefieren un residuo de aminoácido aromático hidrófobo en la posición P1.

55 **[0031]** Para determinar si una proteasa dada es una serina proteasa, y una proteasa de la familia S1, se hace referencia al manual antes mencionado y a los principios indicados en el mismo. Dicha determinación puede llevarse a cabo para todos los tipos de proteasas, ya sean de origen natural o de tipo salvaje; o proteasas genéticamente modificadas o sintéticas.

[0032] Las peptidasas de la familia S1 contienen la tríada catalítica His, Asp y Ser en ese orden. La mutación de cualquiera de los aminoácidos de la tríada catalítica dará lugar a modificación o pérdida de la actividad enzimática. Los aminoácidos de la tríada catalítica de la proteasa S1 1 aislados de *Saccharopolyspora erythrea* (SEQ ID NO: 5) son probablemente las posiciones His - 35, Asp - 63 y Ser - 144.

[0033] La actividad proteasa se puede medir usando cualquier ensayo en el que se emplea un sustrato que incluye enlaces peptídicos relevantes para la especificidad de la proteasa en cuestión. El ensayo de pH y el de temperatura también se deben adaptar a la proteasa en cuestión. Ejemplos de valores de pH del ensayo son pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12. Ejemplos de temperaturas del ensayo son 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 90 o 95°C. Ejemplos de sustratos generales de proteasas son caseína, albúmina de suero bovino y hemoglobina. En el método clásico de Anson y Mirsky, se utiliza hemoglobina desnaturalizada como sustrato y después de la incubación del ensayo con la proteasa en cuestión, se determina la cantidad de hemoglobina soluble en ácido tricloroacético como medida de la actividad de proteasa (Anson, M.L. y Mirsky, A.E., 1932, J. Gen. Physiol. 16:59 y Anson, M.L., 1938, J. Gen. Physiol. 22:79).

[0034] Para el propósito de la presente invención, se determinó la actividad de proteasa utilizando ensayos que se describen en "Materiales y Métodos", tales como el ensayo Suc-AAPF-pNA cinético, el ensayo Protazyme AK, el ensayo Suc-AAPX-pNA cinético y ortoftaldialdehído (OPA). Para el ensayo de Protazyme AK, el sustrato insoluble Protazyme AK (caseína reticulada con Azurina) libera un color azul cuando se incuba con la proteasa y el color se determina como una medida de la actividad de proteasa. Para el ensayo Suc-AAPF-pNA, el sustrato Suc-AAPF-pNA incoloro libera paranitroanilina amarilla cuando se incuba con la proteasa y el color amarillo se determina como una medida de la actividad de proteasa.

[0035] **Variante alélica:** El término "variante alélica" significa cualesquiera dos o más formas alternativas de un gen que ocupan el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge de forma natural a través de la mutación, y puede dar lugar a polimorfismo dentro de las poblaciones. Las mutaciones genéticas pueden ser silenciosas (sin cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tengan secuencias de aminoácidos alteradas. Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

[0036] **ADNc:** El término "ADNc" significa una molécula de ADN que puede prepararse mediante transcripción inversa a partir de una molécula de ARNm madura, empalmada, obtenida a partir de una célula eucariótica. El ADNc carece de secuencias intrónicas que puedan estar presentes en el ADN genómico correspondiente. El transcrito inicial principal de ARN es un precursor del ARNm que se procesa a través de una serie de pasos, incluyendo el empalme, antes de aparecer como ARNm empalmado maduro.

[0037] **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 mediante un marco de lectura abierto, que comienza normalmente con el codón de inicio ATG o codones de inicio alternativos tales como GTG y TTG, y acaba con un codón de terminación tal como TAA, TAG y TGA. La secuencia codificante puede ser un ADN, ADNc o un polinucleótido sintético o recombinante.

[0038] **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 extranjera al polinucleótido que codifica el polipéptido, o nativa o extranjera a cada una de las otras. Dichas secuencias de control incluyen, pero no se limitan a, un líder, una secuencia de poliadenilación, una secuencia propeptídica, un promotor, una secuencia de péptido señal y un terminador de transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor, y señales de parada transcripcional y traduccional. Las secuencias de control pueden proporcionarse con enlazadores con el propósito de introducir sitios de restricción específicos que faciliten la unión de las secuencias de control con la región codificante del polinucleótido que codifica un polipéptido.

[0039] **Expresión:** El término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción del polipéptido incluyendo, pero sin limitarse a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.

[0040] **Vector de expresión:** El término "vector de expresión" significa una molécula de ADN lineal o circular que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido y que está operativamente enlazada a nucleótidos adicionales que garantizan su expresión.

[0041] **Fragmento:** El término "fragmento" significa un polipéptido que tiene uno o más (varios) aminoácidos eliminados de los extremos amino y/o carboxilo de un polipéptido maduro; donde el fragmento tiene actividad proteasa. En un aspecto, un fragmento contiene al menos 169 residuos de aminoácidos (*p. ej.*, los aminoácidos 10 a 178 de SEQ ID NO: 2), o al menos 179 residuos de aminoácidos (*p. ej.*, los aminoácidos 5 a 183 de SEQ ID NO: 2); o de manera correspondiente para SEQ ID NO: 4, un fragmento contiene al menos

169 residuos de aminoácidos (*p. ej.*, los aminoácidos 10 a 178 de SEQ ID NO: 4), o al menos 179 residuos de aminoácidos (*p. ej.*, los aminoácidos 5 a 183 de SEQ ID NO: 4); o de manera correspondiente para SEQ ID NO: 5, un fragmento contiene al menos 169 residuos de aminoácidos (*p. ej.*, los aminoácidos 10 a 178 de SEQ ID NO: 5), o al menos 179 residuos de aminoácidos (*p. ej.*, los aminoácidos 5 a 183 de SEQ ID NO: 5).

[0042] Célula huésped: El término "célula huésped" significa cualquier tipo de célula que es susceptible de transformación, transfección, transducción y similares con un constructo de ácidos nucleicos o un vector de expresión que comprenden un polinucleótido de la presente invención. El término "célula huésped" abarca cualquier descendiente de una célula madre que no es idéntico a la célula madre debido a mutaciones que se producen durante la replicación.

[0043] Polinucleótido aislado: El término "polinucleótido aislado" significa un polinucleótido modificado por la mano del hombre en relación con ese polinucleótido tal como se encuentra en la naturaleza. En un aspecto, el polinucleótido aislado es al menos un 1 % puro, *p. ej.*, al menos un 5% puro, al menos un 10 % puro, al menos un 20 % puro, al menos un 40 % puro, al menos un 60 % puro, al menos un 80 % puro, al menos un 90 % puro y al menos un 95 % puro, tal y como se determina mediante electroforesis de agarosa. Los polinucleótidos pueden ser de origen genómico, ADNc, ARN, semisintético, sintético o cualquier combinación de los mismos.

[0044] Polipéptido aislado: El término polipéptido aislado significa un polipéptido modificado por la mano del hombre en relación con ese polipéptido tal como se encuentra en la naturaleza mezclado con otros componentes, tales como otros polipéptidos, metabolitos secundarios, sales, *et alia*. En un aspecto, el polipéptido es al menos un 1 % puro, *p. ej.*, al menos un 5% puro, al menos un 10 % puro, al menos un 20 % puro, al menos un 40 % puro, al menos un 60 % puro, al menos un 80 % puro y al menos un 90 % puro, tal y como se determina mediante SDS-PAGE.

[0045] Polipéptido maduro: El término "polipéptido maduro" significa un polipéptido en su forma final después de la traducción y de cualquier modificación postraduccional, como procesamiento del terminal N, truncamiento de terminal C, glicosilación, fosforilación, etc. En un aspecto, el polipéptido maduro consiste en los aminoácidos 1 a 190 de SEQ ID NO: 2 basados en el programa predictivo SignalP (Nielsen et al., 1997, Protein Engineering 10: 1-6) que también predice -183 a -157 de SEQ ID NO: 2 son un péptido señal. En otro aspecto, el polipéptido maduro consiste en los aminoácidos 1 a 190 de SEQ ID NO: 4 basados en secuenciación usando la degradación de Edman y el análisis de peso molecular intacto. Los aminoácidos -184 a -157 de SEQ ID NO: 4 son el péptido señal de Savinasa. Se sabe en la técnica que una célula huésped puede producir una mezcla de dos o más polipéptidos maduros diferentes (*es decir.*, con un aminoácido C-terminal y/o N-terminal diferente) expresado por el mismo polinucleótido. También se conoce en la técnica que diferentes células huésped procesan los polipéptidos de manera diferente y, por lo tanto, una célula huésped que expresa un polinucleótido puede producir un polipéptido maduro diferente (*p. ej.*, que tiene un aminoácido C - terminal y/o N - terminal diferente) en comparación con otra célula huésped que expresa el mismo polinucleótido.

[0046] 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 553 a 1122 de SEQ ID NO: 1 basados en el programa predictivo SignalP (Nielsen et al., 1997, Protein Engineering 10: 1-6) que predice también que los nucleótidos 1 a 84 de SEQ ID NO: 1 codifican un péptido señal. En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos 550 a 1119 de SEQ ID NO: 3 basados en la secuenciación usando la degradación de Edman y el análisis del peso molecular intacto del polipéptido maduro. Los nucleótidos 1 a 81 de la SEQ ID NO: 3 codifican el péptido señal de la Savinasa.

[0047] Constructo de ácidos nucleicos: El término "constructo de ácidos nucleicos" significa una molécula de ácidos nucleicos, de cadena sencilla o doble, aislada de un gen de origen natural o modificada para contener segmentos de ácidos nucleicos de una manera que de otro modo no existiría en la naturaleza o que es sintético. El término constructo de ácidos nucleicos es sinónimo del término "casete de expresión" cuando el constructo de ácidos nucleicos contiene las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia codificante de la presente invención.

[0048] Operativamente enlazado: El término "operativamente enlazado" significa una configuración en la que una secuencia de control se coloca en una posición apropiada con respecto a la secuencia codificante de un polinucleótido de tal manera que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia codificante.

[0049] Identidad de Secuencia: La relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se describe mediante el parámetro "identidad de secuencia".

[0050] Para los propósitos de la presente invención, el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J.

Mol. Biol. 48:443-453) tal como se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16:276-277), preferiblemente versión 3.0.0 o posterior. Los parámetros opcionales utilizados son penalización de apertura de gap de 10, penalización por extensión gap de 0,5 y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (EMBOSS versión de BLOSUM62). El resultado de Needle etiquetado como "identidad más larga" (obtenida usando la opción -nobrief) se usa como el porcentaje de identidad y se calcula de la siguiente manera:

(Residuos idénticos x 100) / (Longitud del alineamiento - Número total de gaps en el alineamiento)

[0051] Para los propósitos de la presente invención, se determina el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de desoxirribonucleótidos utilizando el algoritmo Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, *supra*) tal como se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, *supra*), preferiblemente versión 3.0.0 o posterior. Los parámetros opcionales utilizados son penalización de apertura de gap de 10, penalización por extensión gap de 0,5 y la matriz de sustitución EDNAFULL (EMBOSS versión de NCBI NUC4.4). El resultado de Needle etiquetado como "identidad más larga" (obtenida usando la opción -nobrief) se usa como el porcentaje de identidad y se calcula de la siguiente manera:

(Desoxirribonucleótidos idénticos x 100) / (Longitud del alineamiento - Número total de espacios en el alineamiento)

[0052] Condiciones de astringencia: Las diferentes condiciones de astringencia se definen como sigue.

[0053] La expresión "condiciones de astringencia muy baja" significa sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en SSPE 5X, SDS al 0,3 %, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y formamida del 25 % siguiendo los procedimientos estándar de transferencia de Southern durante 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces durante 15 minutos cada una usando 2X SSC, SDS al 0,2 % a 45°C.

[0054] El término "condiciones de astringencia baja" significa sondas de por lo menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en SSPE 5X, SDS al 0,3 %, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y formamida del 25 %, siguiendo procedimientos estándar de transferencia de Southern durante 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces durante 15 minutos cada una usando 2X SSC, SDS al 0,2 % a 50°C.

[0055] El término "condiciones de astringencia media" significa sondas de por lo menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en SSPE 5X, SDS al 0,3 %, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y formamida del 35 %, siguiendo los procedimientos estándar de transferencia de Southern durante 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces durante 15 minutos cada una usando 2X SSC, SDS al 0,2 % a 55°C.

[0056] La expresión "condiciones de astringencia media-alta" significa sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en SSPE 5X, SDS al 0,3 %, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y formamida del 35 % siguiendo los procedimientos estándar de transferencia de Southern durante 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces durante 15 minutos cada una usando 2X SSC, SDS al 0,2 % a 60°C.

[0057] El término "condiciones de astringencia alta" significa sondas de por lo menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, SDS al 0,3 %, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y formamida del 50%, siguiendo procedimientos estándar de transferencia de Southern durante 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces durante 15 minutos cada una usando 2X SSC, SDS al 0,2 % a 65°C.

[0058] La expresión "condiciones de astringencia muy alta" significa sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en SSPE 5X, SDS al 0,3 %, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y formamida del 50% siguiendo los procedimientos estándar de transferencia de Southern durante 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces durante 15 minutos cada una usando 2X SSC, SDS al 0,2 % a 70°C.

[0059] Subsecuencia: El término subsecuencia significa un polinucleótido que tiene uno o más (varios) nucleótidos eliminados del extremo 5' y/o 3' de una secuencia codificante del polipéptido maduro; en el que la subsecuencia codifica un fragmento que tiene actividad de proteasa. En un aspecto, una subsecuencia contiene al menos 507 nucleótidos (*p. ej.*, los nucleótidos 580 a 1086 de SEQ ID NO: 1), o al menos 537 nucleótidos (*p. ej.*, los nucleótidos 565 a 1101 de SEQ ID NO: 1). En otro aspecto, una subsecuencia contiene al menos 507 nucleótidos (*p. ej.*, los nucleótidos 577 a 1083 de SEQ ID NO: 3), o al menos 537 nucleótidos (*p. ej.*, los nucleótidos 562 a 1098 de SEQ ID NO: 3).

[0060] Polinucleótido sustancialmente puro: El término "polinucleótido sustancialmente puro" significa un

preparado de polinucleótidos libre de otros nucleótidos extraños o no deseados y en una forma adecuada para su uso dentro de sistemas de producción de polipéptidos modificados genéticamente. Por lo tanto, un polinucleótido sustancialmente puro contiene como máximo un 10 %, como máximo un 8 %, como máximo un 6 %, como máximo un 5 %, como máximo un 4 %, como máximo un 3 %, como máximo un 2 %, como máximo un 1 %, como máximo un 0,5 % en peso de otro material de polinucleótidos con el que está asociado de forma nativa o recombinante. Sin embargo, un polinucleótido sustancialmente puro puede incluir regiones 5 'y 3' no traducidas de origen natural, tales como promotores y terminadores. Preferiblemente, el polinucleótido es al menos un 90% puro, *p. ej.*, al menos un 92% puro, al menos un 94% puro, al menos un 95% puro, al menos un 96% puro, al menos un 97% puro, al menos un 98% puro, al menos un 99 % puro y al menos un 99,5 % puro en peso. Los polinucleótidos de la presente invención están preferiblemente en una forma sustancialmente pura.

[0061] Polipéptido sustancialmente puro: El término "polipéptido sustancialmente puro" significa un preparado que contiene como máximo un 10 %, como máximo un 8 %, como máximo un 6 %, como máximo un 5 %, como máximo un 4 %, como máximo un 3 %, como máximo un 2 %, como máximo un 1 % y como máximo un 0,5 % en peso de otro material polipeptídico con el que está asociado de forma nativa o recombinante. Preferiblemente, el polipéptido es al menos un 92% puro, *p. ej.*, al menos un 94% puro, al menos un 95% puro, al menos un 96% puro, al menos un 97% puro, al menos un 98% puro, al menos un 99,5% puro y un 100 % puro en peso del material polipeptídico total presente en el preparado. Los polipéptidos de la presente invención están preferiblemente en una forma sustancialmente pura. Esto se puede conseguir, por ejemplo, preparando el polipéptido por métodos recombinantes bien conocidos o por métodos clásicos de purificación.

[0062] Variante: El término "variante" significa un polipéptido que tiene actividad de proteasa y que tiene al menos un 85 %, *p. ej.*, al menos un 86 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5, 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 un reemplazo de un aminoácido que ocupa una posición con un aminoácido diferente; una delección significa la eliminación de, *p. ej.*, los residuos de aminoácidos 1-5 que ocupan 1-5 posiciones; y una inserción significa añadir, *p. ej.*, 1-5 aminoácidos adyacentes a un aminoácido que ocupa una posición. Las variantes de la presente invención tienen al menos un 20 %, *p. ej.*, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, o al menos un 100 % de la actividad de proteasa del polipéptido de SEQ ID NO 5. Una variante también puede ser una proteasa de origen natural que tiene al menos un 85 %, *p. ej.*, al menos un 86 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5.

40 Descripción detallada de la invención

Polipéptidos que tienen actividad de proteasa

[0063] La presente invención se refiere al uso en piensos para animales o detergentes, de polipéptidos aislados que tienen actividad de proteasa seleccionados del grupo que se compone de:

(a) un polipéptido que tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 91%, al menos un 92%, al menos un 93%, al menos un 94%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99% o un 100% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5;

(b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta o condiciones de astringencia muy alta con:

(i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 1;

(ii) la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 3;

(iii) la cadena complementaria completa de (i) o (ii);

(c) un polipéptido codificado por un polinucleótido que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98%, al menos un 99% o un 100% de identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3; y/o

(d) una variante que comprende una sustitución, delección y/o inserción de uno o más (varios) aminoácidos de la SEQ ID NO: 5; y

(e) un fragmento de un polipéptido de (a), (b), (c) o (d), que tiene actividad proteasa.

[0064] La presente invención se refiere al uso en piensos para animales o detergentes de polipéptidos aislados que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2 de al menos un 80 % *p. ej.*, al menos un 85 %, al menos un 87 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 %, que tienen

actividad proteasa. En un aspecto, los polipéptidos difieren en no más de treinta y seis aminoácidos, *p. ej.*, de treinta aminoácidos, de veinticinco aminoácidos, 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 del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2.

[0065] La presente invención también se refiere al uso en piensos para animales o detergentes de polipéptidos aislados que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 4 de al menos un 80 % *p. ej.*, al menos un 85 %, al menos un 87 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 %, que tienen actividad proteasa. En un aspecto, los polipéptidos difieren en no más de treinta y seis aminoácidos, *p. ej.*, de treinta aminoácidos, de veinticinco aminoácidos, 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 del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 4.

[0066] La presente invención se refiere además al uso en piensos para animales o detergentes de polipéptidos aislados que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 5 de al menos un 80 %, *p. ej.*, al menos un 85 %, al menos un 87 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 %, que tienen actividad proteasa. En un aspecto, los polipéptidos difieren en no más de treinta y seis aminoácidos, *p. ej.*, de treinta aminoácidos, de veinticinco aminoácidos, 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 del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 5.

[0067] Una realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido para uso en piensos para animales o detergentes que tiene al menos una identidad de secuencia del 80 % con el polipéptido de SEQ ID NO: 5.

[0068] Una realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido para uso en piensos para animales o detergentes que tiene al menos una identidad de secuencia del 82 % con el polipéptido de SEQ ID NO: 5.

[0069] Una realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido para uso en piensos para animales o detergentes que tiene al menos una identidad de secuencia del 84% con el polipéptido de SEQ ID NO: 5.

[0070] Una realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido para uso en piensos para animales o detergentes que tiene al menos una identidad de secuencia del 85% con el polipéptido de SEQ ID NO: 5.

[0071] Una realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido para uso en piensos para animales o detergentes que tiene al menos una identidad de secuencia del 86% con el polipéptido de SEQ ID NO: 5.

[0072] Una realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido para uso en piensos para animales o detergentes que tiene al menos una identidad de secuencia del 87% con el polipéptido de SEQ ID NO: 5.

[0073] Una realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido para uso en piensos para animales o detergentes que tiene al menos una identidad de secuencia del 88% con el polipéptido de SEQ ID NO: 5.

[0074] Una realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido para uso en piensos para animales o detergentes que tiene al menos una identidad de secuencia del 89% con el polipéptido de SEQ ID NO: 5.

[0075] Una realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido para uso en piensos para animales o detergentes que tiene al menos una identidad de secuencia del 90% con el polipéptido de SEQ ID NO: 5.

[0076] Una realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido para uso en piensos para animales o detergentes que tiene al menos una identidad de secuencia del 91% con el

polipéptido de SEQ ID NO: 5.

5 **[0077]** Una realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido para uso en piensos para animales o detergentes que tiene al menos una identidad de secuencia del 92% con el polipéptido de SEQ ID NO: 5.

10 **[0078]** Una realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido para uso en piensos para animales o detergentes que tiene al menos una identidad de secuencia del 93% con el polipéptido de SEQ ID NO: 5.

[0079] Una realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido para uso en piensos para animales o detergentes que tiene al menos una identidad de secuencia del 94% con el polipéptido de SEQ ID NO: 5.

15 **[0080]** Una realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido para uso en piensos para animales o detergentes que tiene al menos una identidad de secuencia del 95% con el polipéptido de SEQ ID NO: 5.

20 **[0081]** Una realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido para uso en piensos para animales o detergentes que tiene al menos una identidad de secuencia del 96% con el polipéptido de SEQ ID NO: 5.

25 **[0082]** Una realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido para uso en piensos para animales o detergentes que tiene al menos una identidad de secuencia del 97% con el polipéptido de SEQ ID NO: 5.

30 **[0083]** Una realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido para uso en piensos para animales o detergentes que tiene al menos una identidad de secuencia del 98% con el polipéptido de SEQ ID NO: 5.

[0084] Una realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido para uso en piensos para animales o detergentes que tiene al menos una identidad de secuencia del 99% con el polipéptido de SEQ ID NO: 5.

35 **[0085]** Una realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido para uso en piensos para animales o detergentes que tiene una identidad de secuencia del 100% con el polipéptido de SEQ ID NO: 5.

40 **[0086]** Un polipéptido a utilizar en la presente invención preferiblemente comprende o se compone de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 y/o SEQ ID NO: 5 o una variante alélica de la misma; o es un fragmento en el que faltan, p. ej., 30, 25, 20, 15, 10 o 5 aminoácidos del N- y/o C - terminal y que tiene actividad de proteasa. En otro aspecto, el polipéptido comprende o se compone de n la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 4 y/o SEQ ID NO: 5. En otro aspecto preferido, el polipéptido maduro comprende o se compone de los aminoácidos 1 a 190 de SEQ ID NO: 2, los aminoácidos 1 a 190 de la SEQ ID NO: 4 y/o los aminoácidos 1 a 190 de la SEQ ID NO: 5.

50 **[0087]** La presente invención también se refiere a polipéptidos aislados que tienen actividad de proteasa que están codificados por polinucleótidos que se hibridan en condiciones de astringencia alta o muy alta con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 1, (ii) el polipéptido maduro de la secuencia codificante de SEQ ID NO: 3, o (iii) la cadena complementaria de longitud completa de (i) o (ii) (J. Sambrook, E.F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor, Nueva York).

55 **[0088]** El polinucleótido de SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 3; o una subsecuencia de los mismos, así como la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 y/o SEQ ID NO: 5, o un fragmento de los mismos, puede usarse para diseñar sondas de ácidos nucleicos para identificar y clonar ADN que codifica polipéptidos que tienen actividad de proteasa a partir de cepas de diferentes géneros o especies según métodos bien conocidos en la técnica. En particular, estas sondas pueden utilizarse para la hibridación con el ADN genómico o el ADNc del género o especie de interés, siguiendo procedimientos estándar de transferencia de Southern, con el fin de identificar y aislar el gen correspondiente en el mismo. Dichas sondas pueden ser considerablemente más cortas que la secuencia completa, pero deben ser al menos de 14, p. ej., al menos de 25, al menos de 35, o al menos de 70 nucleótidos de longitud. Preferiblemente, la sonda de ácidos nucleicos tiene una longitud de al menos 100 nucleótidos, p. ej., 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. Pueden usarse sondas de ADN y ARN. Las sondas se marcan típicamente para detectar el gen correspondiente (por ejemplo, con ³²P,

³H, ³⁵S, biotina o avidina). Tales sondas están incluidas en la presente invención.

[0089] Una biblioteca de ADN genómico o de ADNc preparada a partir de dichas otras cepas puede ser seleccionada para ADN que hibrida con las sondas descritas anteriormente y codifica un polipéptido que tiene actividad de proteasa. El ADN genómico o de otro tipo de estas otras cepas puede separarse mediante electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida u otras técnicas de separación. El ADN de las bibliotecas o el ADN separado puede transferirse e inmovilizarse en nitrocelulosa u otro material portador adecuado. Con el fin de identificar un clon o ADN que es homólogo a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3; o una subsecuencia de la misma, el material portador se usa preferiblemente en una transferencia de Southern.

[0090] Para los fines de la presente invención, la hibridación indica que el polinucleótido se hibrida con una sonda de ácidos nucleicos marcada que corresponde a la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 1; la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 3; su cadena complementaria de longitud completa; o una subsecuencia de la misma; bajo condiciones de astringencia de alta a muy alta. Las moléculas a las que se hibrida la sonda de ácidos nucleicos en estas condiciones se pueden detectar usando, por ejemplo, una película radiográfica.

[0091] 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, SEQ ID NO: 4 y/o SEQ ID NO: 5 o un fragmento del mismo. En otro aspecto preferido, la sonda de ácidos nucleicos es SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3.

[0092] Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, se definen condiciones de astringencia alta a muy alta como prehibridación e hibridación a 42°C en SSPE 5X, SDS al 0,3 %, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y formamida al 25 % para astringencias muy bajas y bajas, formamida al 35% para astringencias medias y medias-altas o formamida al 50% para astringencias altas y muy altas, siguiendo procedimientos estándar de transferencia de Southern durante 12 a 24 horas de forma óptima. El material portador se lava finalmente tres veces durante 15 minutos cada una usando 2X SSC, SDS al 0,2 % a 65°C (astringencia alta) y a 70°C (astringencia muy alta).

[0093] Para sondas cortas de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, las condiciones de astringencia se definen como prehibridación e hibridación a una temperatura de aproximadamente 5°C a aproximadamente 10°C por debajo de la T_f calculada utilizando el cálculo según Bolton y McCarthy (1962, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 48: 1390) en NaCl 0,9 M, Tris-HCl 0,09 M pH 7,6, EDTA 6 mM, NP-40 al 0,5%, solución de Denhardt 1X, pirofosfato sódico 1 mM, fosfato monobásico sódico 1 mM, ATP 0,1 mM y 0,2 mg de ARN de levadura por ml siguiendo procedimientos estándar de transferencia de Southern durante 12 a 24 horas de manera óptima. El material portador se lava finalmente una vez en 6X SSC más SDS del 0,1 % durante 15 minutos y dos veces cada una durante 15 minutos usando 6X SSC a una temperatura de 5°C a 10°C por debajo de la T_f calculada.

[0094] La presente invención también se refiere al uso en piensos para animales o detergentes de polipéptidos aislados que tienen actividad de proteasa codificada por polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 1 de al menos un 80 % *p. ej.*, al menos un 85 %, al menos un 87 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 % al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 %.

[0095] La presente invención se refiere además al uso de polipéptidos aislados en piensos de animales o detergentes, que tienen actividad de proteasa codificada por polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia con la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEQ ID No.: 3 de al menos un 80 %, por ejemplo, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99% o el 100%.

[0096] En formas de realización particulares, las proteasas progenitoras y/o las variantes de proteasa de la invención y para usar según la invención se seleccionan del grupo que se componed de:

(a) Proteasas pertenecientes al grupo enzimático EC 3.4.21; y

(b) Serina proteasas de la familia de las peptidasas S1; tal como se describe en Biochem.J. 290: 205 - 218 (1993) y en la base de datos de la proteasa MEROPS, versión 9.5 (www.merops.ac.uk). La base de datos se describe en Rawlings, N.D., Barrett, A.J. & Bateman, A. (2010) "MEROPS: thepeptidase database". Nucleic Acids Res 38, D227-D233.

[0097] Para determinar si una proteasa dada es una serina proteasa, y una proteasa de la familia S1, se hace referencia al manual antes mencionado y a los principios indicados en el mismo. Dicha determinación puede llevarse a cabo para todos los tipos de proteasas, ya sean de origen natural o de tipo salvaje; o proteasas

genéticamente modificadas o sintéticas.

- 5 **[0098]** La presente invención también se refiere a variantes de polipéptidos que tienen actividad de proteasa y que tienen al menos un 85 %, por ejemplo, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5 que comprenden al menos una sustitución, delección y/o inserción de al menos uno o más (varios) aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o una secuencia homóloga de la misma.
- 10 **[0099]** La variante del polipéptido de la invención puede tener en una realización al menos un 86 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5.
- 15 **[0100]** La variante del polipéptido de la invención puede tener en una realización al menos un 87% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5.
- [0101]** La variante del polipéptido de la invención puede tener en una realización al menos un 88% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5.
- 20 **[0102]** La variante del polipéptido de la invención puede tener en una realización al menos un 89% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5.
- [0103]** La variante del polipéptido de la invención puede tener en una realización al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5.
- 25 **[0104]** La variante del polipéptido de la invención puede tener en una realización al menos un 91% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5.
- [0105]** La variante del polipéptido de la invención puede tener en una realización al menos un 92% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5.
- 30 **[0106]** La variante del polipéptido de la invención puede tener en una realización al menos un 93% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5.
- [0107]** La variante del polipéptido de la invención puede tener en una realización al menos un 94% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5.
- 35 **[0108]** La variante del polipéptido de la invención puede tener en una realización al menos un 95% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5.
- 40 **[0109]** La variante del polipéptido de la invención puede tener en una realización al menos un 96% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5.
- [0110]** La variante del polipéptido de la invención puede tener en una realización al menos un 97% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5.
- 45 **[0111]** La variante del polipéptido de la invención puede tener en una realización al menos un 98% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5.
- 50 **[0112]** La variante del polipéptido de la invención puede tener en una realización al menos un 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5.
- [0113]** En una realización adicional, el número total de posiciones de la variante del polipéptido de la invención que tienen sustituciones, delecciones y/o inserciones de aminoácidos no es mayor que 27, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 o 27. Los cambios en aminoácidos pueden ser de naturaleza menor, es decir, sustituciones o inserciones conservativas de aminoácidos que no afectan significativamente al plegado y/o actividad de la proteína; pequeñas delecciones, típicamente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; pequeñas extensiones del amino- o carboxilo-terminal, tales como un residuo de metionina en el amino-terminal; un péptido enlazante pequeño de hasta 20-25 residuos aproximadamente; 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.
- 55 **[0114]** En otra realización, la presente invención también se refiere a variantes para uso en piensos para animales o detergentes que comprenden una sustitución, delección y/o inserción de uno o más aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o una secuencia homóloga de la misma. El número total de posiciones que tienen sustituciones, delecciones y/o inserciones de aminoácidos en la SEQ ID NO: 2 no es mayor que 36, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30,
- 60

31, 32, 33, 34, 35 o 36. Los cambios en aminoácidos pueden ser de naturaleza menor, es decir, sustituciones o inserciones conservativas de aminoácidos que no afectan significativamente al plegado y/o actividad de la proteína; pequeñas deleciones, típicamente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; pequeñas extensiones del amino- o carboxilo-terminal, tales como un residuo de metionina en el amino-terminal; un péptido enlazante pequeño de hasta 20-25 residuos aproximadamente; o una pequeña extensión que facilita la purificación cambiando la carga neta u otra función, tal como un tracto polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión.

[0115] En otra realización, la presente invención también se refiere a variantes para uso en piensos para animales o detergentes que comprenden una sustitución, deleción y/o inserción de uno o más aminoácidos de SEQ ID NO: 4 o una secuencia homóloga de la misma. El número total de posiciones que tienen sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos en la SEQ ID NO: 4 no es mayor que 36, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 o 36. Los cambios en aminoácidos pueden ser de naturaleza menor, es decir, sustituciones o inserciones conservativas de aminoácidos que no afectan significativamente al plegado y/o actividad de la proteína; pequeñas deleciones, típicamente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; pequeñas extensiones del amino- o carboxilo-terminal, tales como un residuo de metionina en el amino-terminal; un péptido enlazante pequeño de hasta 20-25 residuos aproximadamente; o una pequeña extensión que facilita la purificación cambiando la carga neta u otra función, tal como un tracto polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión.

[0116] En otra realización, la presente invención también se refiere a variantes para uso en piensos para animales o detergentes que comprenden una sustitución, deleción y/o inserción de uno o más (varios) aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o una secuencia homóloga de la misma. El número total de posiciones que tienen sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos en la SEQ ID NO: 5 no es mayor que 36, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 o 36. Los cambios en aminoácidos pueden ser de naturaleza menor, es decir, sustituciones o inserciones conservativas de aminoácidos que no afectan significativamente al plegado y/o actividad de la proteína; pequeñas deleciones, típicamente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; pequeñas extensiones del amino- o carboxilo-terminal, tales como un residuo de metionina en el amino-terminal; un péptido enlazante pequeño de hasta 20-25 residuos aproximadamente; o una pequeña extensión que facilita la purificación cambiando la carga neta u otra función, tal como un tracto polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión.

[0117] Los ejemplos de sustituciones conservadoras están dentro del grupo de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrófobos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) y pequeños aminoácidos (glicina, alanina, serina, treonina y metionina). Las sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran la actividad específica se conocen en la técnica y son descritos, por ejemplo, por H. Neurath y R.L. Hill, 1979, In, *The Proteins*, Academic Press, Nueva York. Los intercambios más frecuentes son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu y Asp/Gly.

[0118] Alternativamente, los cambios de aminoácidos son de tal naturaleza que se alteran las propiedades fisicoquímicas de los polipéptidos. Por ejemplo, los cambios de aminoácidos pueden mejorar la estabilidad térmica del polipéptido, alterar la especificidad del sustrato, cambiar el pH óptimo, y similares. Los aminoácidos esenciales en un polipéptido progenitor pueden identificarse de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida o mutagénesis por barrido de alanina (Cunningham y Wells, 1989, *Science* 244: 1081 - 1085). En esta última técnica, se introducen mutaciones de alanina únicas en cada residuo en la molécula y se prueban las moléculas mutantes resultantes para determinar la actividad de la proteasa con el fin de identificar los residuos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula. Ver también, Hilton et al., 1996, *J. Biol. Chem.* 271:4699-4708. El sitio activo de la enzima u otra interacción biológica puede determinarse también mediante análisis físico de la estructura, tal como se determina mediante técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrones o marcaje de fotoafinidad, junto con la mutación de aminoácidos putativos del sitio de contacto. 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 deducirse del análisis de identidades con polipéptidos que están relacionados con el polipéptido progenitor.

[0119] Se pueden preparar y probar sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos individuales o múltiples, utilizando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación y/o barajado, seguidos de un procedimiento de cribado pertinentes, tales como los descritos por Reidhaar-Olson y Sauer, 1988, *Science* 241: 53-57; Bowie y Sauer, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 86: 2152 - 2156; WO 95/17413; o WO 95/22625. Otros métodos que se pueden utilizar incluyen la PCR propensa a errores, despliegue de fagos (p.ej., Lowman et al., 1991, *Biochemistry* 30: 10832 - 10883; Patente EE. UU. n.º 5.223.409; WO 92/06204), y mutagénesis dirigida (Derbyshire et al., 1986, *Gene* 46: 145; Ner et al., 1988, *ADN* 7: 127).

[0120] Los métodos de mutagénesis/barajado se pueden combinar con métodos de cribado automatizados de alto rendimiento para detectar la actividad de polipéptidos clonados y mutagenizados expresados por células huésped (Ness et al., 1999, Nature Biotechnology 17: 893 - 896). Las moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos activos pueden recuperarse de las células huésped y secuenciarse rápidamente usando métodos estándar en la técnica. Estos métodos permiten determinar rápidamente la importancia de los residuos de aminoácidos individuales en un polipéptido.

[0121] El polipéptido puede ser un polipéptido híbrido en el que una porción de un polipéptido está fusionada con el N-terminal o el C-terminal de una porción de otro polipéptido.

[0122] El polipéptido puede ser un polipéptido fusionado o polipéptido divisible de fusión en el que otro polipéptido está fusionado con el N-terminal o el C-terminal del polipéptido de la presente invención. Se produce un polipéptido fusionado fusionando un polinucleótido que codifica otro polipéptido a un polinucleótido de la presente invención. Las técnicas para producir polipéptidos de fusión son conocidas en la técnica e incluyen ligar las secuencias codificantes que codifican los polipéptidos de manera que estén en el marco y que la expresión del polipéptido fusionado esté bajo control del mismo promotor y terminador. También se pueden construir proteínas de fusión utilizando tecnología de inteína en la que se crean fusiones después de la traducción (Cooper et al., 1993, EMB J. 12: 2575 - 2583; Dawson et al., 1994, Science 266: 776 - 779).

[0123] Un polipéptido de fusión puede comprender además un sitio de escisión entre los dos polipéptidos. Tras la secreción de la proteína de fusión, el sitio se escinde liberando los dos polipéptidos. Ejemplos de sitios de escisión incluyen, pero no se limitan a, 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. Reinar. Microbiol. 63:3488-3493; Ward 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.

Formas de realización

[0124] En ciertas formas de realización de la invención, la proteasa de la invención exhibe propiedades térmicas beneficiosas tales como termoestabilidad, estabilidad al vapor, etc. y/o propiedades de pH beneficiosas, tales como estabilidad ácida, pH óptimo, etc.

[0125] Una realización de la invención son los polipéptidos aislados para uso en piensos para animales y detergentes, que tienen actividad mejorada de proteasa entre pH 6 y 9, tal como a pH 6, a pH 8, a pH 9 a 25°C en comparación con la proteasa 10R.

[0126] Una realización adicional de la invención son los polipéptidos aislados para uso en piensos para animales y detergentes que tienen una estabilidad mejorada a pH 2 o a pH 11 a 37°C en comparación con la proteasa 10R.

[0127] Una realización adicional de la invención son los polipéptidos aislados para uso en piensos para animales y detergentes, que tienen actividad mejorada de proteasa en harina de maíz y soja entre pH 3,0 y 7,0, tal como entre pH 5,0 y pH 7,0, tal como a pH 5,0, 6,0 o 7,0 a 40 ° C en comparación con la proteasa 10R.

[0128] Otra realización de la invención son los polipéptidos aislados para uso en piensos para animales y detergentes que tienen actividad proteolítica mejorada de la digestión de pollos de engorde expresada como el nivel de aminas primarias en el cultivo después de 3 horas en comparación con el blanco.

Propiedades de acidez/alcalinidad

[0129] En ciertas formas de realización de la invención, la proteasa de la invención exhibe propiedades beneficiosas con respecto al pH, tales como estabilidad ácida, pH óptimo, etc. La estabilidad de la proteasa a un pH bajo es beneficiosa puesto que la proteasa puede tener actividad en el intestino después de pasar a través del estómago. En una realización de la invención, la proteasa retiene una actividad > 95 % después de 2 horas a pH 2 según se determina usando el método descrito en el ejemplo 3.

Propiedades de actividad de pH

[0130] El perfil de actividad de pH de la proteasa se puede determinar cómo se describe en el Ejemplo 3. La actividad a pH 6-8 puede ser beneficiosa para la digestión de proteínas en el intestino de un animal.

[0131] En una realización, la invención comprende una proteasa para uso en piensos para animales que tiene un perfil de actividad de pH a 25°C con una actividad relativa de 0,7 o superior a pH 8 cuando se compara con la actividad de la proteasa a pH 10 (cf. Ejemplo 3).

5 Termoestabilidad

[0132] La termoestabilidad se puede determinar cómo se describe en el Ejemplo 6, es decir, usando mediciones DSC para determinar la temperatura de desnaturalización, T_d , de la proteasa purificada. La T_d es indicativa de la termoestabilidad de la proteína: Cuanto mayor sea la T_d , más alta es la termoestabilidad. Por consiguiente, en una realización preferida, la proteasa de la invención tiene una T_d que es más alta que la T_d de una proteasa de referencia, en la que T_d se determina sobre muestras de proteasas purificadas (preferiblemente con una pureza de al menos un 90 % o un 95 %, tal como se determina mediante SDS-PAGE).

[0133] En formas de realización preferidas, las propiedades térmicas tales como estabilidad calorífica, estabilidad de temperatura, termoestabilidad, estabilidad de vapor y/o estabilidad a la formación de gránulos tal como son proporcionadas por la actividad residual, la temperatura de desnaturalización T_d , u otros parámetros de la proteasa de la invención son mayores que los valores correspondientes, tales como la actividad residual o la T_d , de la proteasa de SEQ ID NO: 5, más preferiblemente de al menos un 101% de los mismos, o al menos un 102%, un 103%, un 104%, un 105%, un 106%, un 107%, un 108 %, un 109 % o al menos un 110 % de los mismos. Aún más preferiblemente, el valor un parámetro, tal como la actividad residual o la T_d , de la proteasa de la invención es al menos un 120 %, un 130 %, un 140 %, un 150 %, un 160 %, un 170 %, un 180 % o al menos un 190 % del valor para la proteasa de SEQ ID NO: 5.

[0134] En otras formas de realización particulares, la proteasa termoestable de la invención tiene una temperatura de fusión, T_f (o una temperatura de desnaturalización, T_d) de al menos 50°C, determinada usando calorimetría diferencial de barrido (DSC) como se describe en el ejemplo 10 (es decir, en acetato sódico 20 mM, pH 4,0). En otras formas de realización particulares adicionales, el T_f 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.

Estabilidad de vapor

[0135] La estabilidad de vapor se puede hallar como se describe en el ejemplo 7 determinando la actividad residual de las moléculas de proteasa después del tratamiento con vapor de agua a 85°C o 90°C durante un breve periodo de tiempo.

Estabilidad de la granulación

[0136] La estabilidad de la formación de gránulos se puede determinar cómo se describe en el ejemplo 8 usando un granulado enzimático premezclado con pienso. Desde el mezclador, el pienso se acondiciona con vapor hasta 95 ° C. Después de acondicionar el pienso se presiona formando gránulos y se determina la actividad residual.

45 **Fuentes de polipéptidos que tienen actividad de proteasa**

[0137] Un polipéptido que tiene actividad proteasa y que se va a utilizar de acuerdo con la presente invención se puede obtener a partir de microorganismos de cualquier género. Para los propósitos de la presente invención, el término "obtenido a partir de" tal como se utiliza en el presente documento en conexión con una fuente dada significará que el polipéptido codificado por un polinucleótido es producido por la fuente o por una cepa en la que se ha insertado el polinucleótido de la fuente. En un aspecto, el polipéptido obtenido a partir de una fuente dada es secretado extracelularmente.

[0138] El polipéptido puede ser un polipéptido bacteriano. Por ejemplo, el polipéptido puede ser un polipéptido que tiene actividad de proteasa de una bacteria gram-positiva dentro de un filo tal como las actinobacterias o de una bacteria gram-negativa dentro de un filo tal como las proteobacterias.

[0139] En un aspecto, el polipéptido es una proteasa de una bacteria de la clase *Actinobacterias*, tal como del orden *Actinomycetales*, o del suborden *Pseudonocardineae*, o de la familia *Pseudonocardiaceae*, o del género *Saccharopolyspora*, o de la especie *Saccharopolyspora erythraea*.

[0140] Se entenderá que, para las especies mencionadas anteriormente, la invención abarca tanto los estados perfectos como los imperfectos, y otros equivalentes taxonómicos, por ejemplo, anamorfos, independientemente del nombre de especie por el que se conocen. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente la identidad de equivalentes apropiados.

[0141] Las cepas de estos taxones son fácilmente accesibles para el público en una serie de colecciones de cultivos, tales como la American Type Culture Collection (ATCC), la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), la Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS) y la Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

[0142] El polipéptido puede identificarse y obtenerse a partir de otras fuentes incluyendo microorganismos aislados de la naturaleza (*p.ej.*, tierra, abono, agua, etc.) utilizando las sondas antes mencionadas. Las técnicas para aislar microorganismos de hábitats naturales son bien conocidas en la técnica. El polinucleótido que codifica el polipéptido puede obtenerse entonces seleccionando de forma similar una biblioteca de ADN genómico o de ADNc de otro microorganismo o muestra de ADN mixta. Una vez que se ha detectado un polinucleótido que codifica un polipéptido con la(s) sonda(s), el polinucleótido puede aislarse o clonarse utilizando técnicas que son bien conocidas por los expertos en la técnica (véase, *p. ej.*, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

15 Polinucleótidos

[0143] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican un polipéptido de la presente invención y se usan para la producción recombinante del polipéptido.

[0144] Las técnicas utilizadas para aislar o clonar un polinucleótido que codifica un polipéptido son conocidas en la técnica e incluyen aislamiento a partir de ADN genómico, preparación a partir de ADNc, o una combinación de los mismos. La clonación de los polinucleótidos a partir de dicho ADN genómico puede efectuarse, *p. ej.*, utilizando la conocida reacción en cadena de polimerasa (PCR) o la selección de anticuerpos de las bibliotecas de expresión para detectar fragmentos de ADN clonados con características estructurales compartidas. Ver, *p. ej.*, Innis *et al.*, 1990, PCR: A Guide to Methods and Application, Academic Press, Nueva York. Pueden usarse otros procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos tales como la reacción en cadena de ligasa (LCR), la transcripción activada por ligación (LAT) y la amplificación basada en polinucleótidos (NASBA). Los polinucleótidos pueden clonarse a partir de una cepa de *Saccharopolyspora*, u otro organismo relacionado con *Actinomicetales* y de este modo, por ejemplo, puede ser una variante alélica o de especie de la región codificante de polipéptido del polinucleótido.

[0145] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que comprenden o se componen de polinucleótidos que tienen un grado de identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 1 de al menos un 80 % *p. ej.*, al menos un 85 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, con la condición de que no sea 100 % idéntico a la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 1, y que codifica un polipéptido que tiene actividad de proteasa.

[0146] La presente invención se refiere además a polinucleótidos aislados que comprenden o consisten en polinucleótidos que tienen un grado de identidad de secuencia con la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEQ ID NO: 3 de al menos un 80 % *p. ej.*, al menos un 85 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 %, que codifican un polipéptido que tiene actividad proteasa.

[0147] 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 no naturales del polipéptido. Estos polipéptidos pueden diferir de alguna manera modificada del polipéptido aislado de su fuente nativa, *p. ej.*, variantes que difieren en actividad específica, termoestabilidad, pH óptimo, o similares. La variante puede construirse sobre la base del polinucleótido presentado como la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, *p. ej.*, una subsecuencia de la misma y/o introduciendo sustituciones de nucleótidos que no dan lugar a un cambio en la secuencia de aminoácidos del polipéptido, pero que corresponden al uso de codones del organismo huésped destinado a la producción de la enzima o introduciendo sustituciones de nucleótidos que pueden dar lugar a una secuencia de aminoácidos diferente. Para una descripción general de la sustitución de nucleótidos, véase, *p. ej.*, Ford *et al.*, 1991, Protein Expression and Purification 2: 95-107.

[0148] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican polipéptidos de la presente invención, los cuales se hibridan bajo condiciones de astringencia alta o muy alta con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 1, (ii) la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 3 (iii) la secuencia de ADN genómico que comprende la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 1, (iv) la secuencia de ADN genómico que comprende la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 3, o (v) la cadena complementaria de longitud completa de i), ii), iii) o iv); o variantes alélicas y sus subsecuencias de la misma (Sambrook *et al.*, 1989, *supra*), como se define en el presente documento.

[0149] En un aspecto, el polinucleótido comprende o consta de SEQ ID NO: 3, la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 3, una subsecuencia de SEQ ID NO: 1 que codifica un fragmento de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5 que tiene actividad de proteasa, o una subsecuencia de SEQ ID NO: 3 que codifica un fragmento de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5 que tiene actividad de proteasa, tal como el polinucleótido de los nucleótidos 550 a 1119 de SEQ ID NO: 3.

Constructos de ácidos nucleicos

[0150] La presente invención se refiere también a constructos de ácidos nucleicos que comprenden un polinucleótido de la presente invención operativamente enlazado a una o más (varias) secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

[0151] Un polinucleótido puede manipularse de diversas maneras para proporcionar la expresión del polipéptido. La manipulación del polinucleótido antes de su inserción en un vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para modificar polinucleótidos utilizando métodos de ADN recombinante son bien conocidas en la técnica.

[0152] La secuencia de control puede ser una secuencia promotora, un polinucleótido que es reconocido por una célula huésped para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. La secuencia promotora contiene secuencias de control transcripcionales que median la expresión del polipéptido. El promotor puede ser cualquier polinucleótido que muestre actividad transcripcional en la célula huésped elegida, incluyendo promotores mutantes, truncados e híbridos, y puede obtenerse a partir de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares, ya sean homólogos o heterólogos a la célula huésped.

[0153] 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 a partir del gen de alfa-amilasa (amyQ) de *Bacillus amyloliquefaciens*, el gen de alfa-amilasa (amyL) de *Bacillus licheniformis*, el gen de penicilinas (penP) de *Bacillus licheniformis*, el gen de amilasa maltogénica (amyM) de *Bacillus stearothermophilus*, el gen de levansacarasa (sacB) de *Bacillus subtilis*, los genes xylA y xylB de *Bacillus subtilis*, el operón lac de *E. coli*, el gen de agarasa (dag A) de *Streptomyces coelicolor* y el gen procariótico de beta-lactamasa (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 75: 3727 - 3731), así como el promotor tac (DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 80: 21-25). Otros promotores se describen en "Useful proteins from recombinant bacteria" en Gilbert et al., 1980, Scientific American, 242: 74-94; y en Sambrook et al., 1989, supra.

[0154] 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 los promotores obtenidos a partir de los genes de acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, alfa-amilasa estable frente al ácido de *Aspergillus niger*, glucoamilasa (glaA) de *Aspergillus niger* o *Aspergillus awamori*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*, proteasa 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*, así como el promotor NA2-tpi (un promotor modificado que incluye un gen que codifica una alfa-amilasa neutra en *Aspergilli* en el que el líder no traducido ha sido reemplazado por un líder no traducido de un gen que codifica triosa fosfato isomerasa en *Aspergilli*; ejemplos no limitantes incluyen promotores modificados incluyendo el gen que codifica alfa-amilasa neutra en *Aspergillus niger* en el que el líder no traducido ha sido reemplazado por un líder no traducido del gen que codifica la triosa fosfato isomerasa en *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae*); y promotores mutantes, truncados e híbridos de los mismos.

[0155] En un huésped de levadura, se obtienen promotores útiles a partir de los genes de enolasa (ENO - 1) de *Saccharomyces cerevisiae*, galactoquinasa (GAL1) de *Saccharomyces cerevisiae*, alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (ADH1, ADH2/GAP) de *Saccharomyces cerevisiae*, triosa fosfato isomerasa (TPI) de *Saccharomyces cerevisiae*, metalotioneina (CUP1) de *Saccharomyces cerevisiae* y 3- fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros promotores útiles para células huésped de levadura son descritos por Romanos et al., 1992, Lev. 8: 423 - 488.

[0156] La secuencia de control también puede ser una secuencia terminadora de transcripción adecuada,

que es reconocida por una célula huésped para terminar la transcripción. La secuencia terminadora está operativamente enlazada al terminal 3' del polinucleótido que codifica el polipéptido. Cualquier terminador que sea funcional en la célula huésped elegida puede ser utilizado en la presente invención.

5 **[0157]** Los terminadores preferidos para las células huésped fúngicas filamentosas se obtienen a partir de los genes de antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y proteasa tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.

10 **[0158]** Los terminadores preferidos para células huésped de levadura se obtienen a partir de los genes de enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, citocromo C (CYC1) *Saccharomyces cerevisiae* y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros terminadores útiles para células huésped de levadura son descritos por Romanos *et al.*, 1992, *supra*.

15 **[0159]** La secuencia de control también puede ser una secuencia líder adecuada, cuando se transcribe una región no traducida de un ARNm que es importante para la traducción por parte de la célula huésped. La secuencia líder está operativamente enlazada al terminal 5' del polinucleótido que codifica el polipéptido. Puede utilizarse cualquier secuencia líder que sea funcional en la célula huésped elegida.

20 **[0160]** Los líderes preferidos para las células huésped fúngicas filamentosas se obtienen a partir de los genes de TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

25 **[0161]** Los líderes adecuados para las células huésped de levadura se obtienen a partir de los genes de enolasa (ENO - 1) de *Saccharomyces cerevisiae*, 3- fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* y alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (ADH2/GAP) de *Saccharomyces cerevisiae*.

30 **[0162]** La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia operativamente enlazada al terminal 3' del polinucleótido y, cuando se transcribe, es reconocida por la célula huésped como una señal para añadir residuos de poliadenosina al ARNm transcrito. Puede utilizarse cualquier secuencia de poliadenilación que sea funcional en la célula huésped de elección.

35 **[0163]** Las secuencias de poliadenilación preferidas para las células huésped fúngicas filamentosas se obtienen a partir de los genes de TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, proteasa tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* y alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*.

[0164] Las secuencias útiles de poliadenilación para células huésped de levadura son descritas por Gua y Sherman, 1995, *Mol. Cellular Biol.* 15:5983-5990.

40 **[0165]** La secuencia de control también puede ser una región codificante de péptido señal que codifica un péptido señal enlazado al N-terminal de un polipéptido y dirige el polipéptido hacia la vía secretora de la célula. El extremo 5 'de la secuencia codificante del polinucleótido puede contener de forma inherente una secuencia codificante de péptido señal enlazada de manera natural en un 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 de péptido señal que es extranjera para la secuencia codificante. La secuencia codificante del péptido de señal extranjera puede ser necesaria cuando la secuencia codificadora no contiene una secuencia codificante de péptido señal de manera natural. Alternativamente, la secuencia codificante del péptido señal extranjera puede simplemente sustituir la secuencia codificante del péptido señal natural con el fin de aumentar la secreción del polipéptido. Sin embargo, puede usarse cualquier secuencia codificante de péptido señal que dirija el polipéptido expresado hacia la vía secretora de una célula huésped elegida.

55 **[0166]** Las secuencias codificantes de péptidos señal eficaces para células huésped bacterianas son las secuencias codificantes de péptido señal obtenidas a partir de los genes de amilasa maltogénica de *Bacillus* NCIB 11837, subtilisina de *Bacillus licheniformis*, beta - lactamasa de *Bacillus licheniformis*, alfa - amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, proteasas neutras (*nprT*, *nprS*, *nprM*) de *Bacillus stearothermophilus* y *prsA* de *Bacillus subtilis*. Otros péptidos señal son descritos por Simonen y Palva, 1993, *Microbiological Reviews* 57: 109-137.

60 **[0167]** Las secuencias codificantes de péptidos señal eficaces para las células huésped fúngicas filamentosas son las secuencias codificantes del péptido señal obtenidas a partir de los genes de 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 proteasa aspártica de *Rhizomucor miehei*.

65 **[0168]** Se obtienen péptidos señal útiles para células huésped de levadura a partir de los genes de factor alfa

de *Saccharomyces cerevisiae* e invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otras secuencias codificantes de péptidos señal útiles son descritas por Romanos *et al.*, 1992, *supra*.

5 [0169] La secuencia de control también puede ser una secuencia codificante de propéptido que codifica un propéptido situado en el N-terminal de un polipéptido. El polipéptido resultante se conoce como proenzima o propolipéptido (o zimógeno en algunos casos). Un propolipéptido está generalmente inactivo y puede convertirse en un polipéptido activo por escisión catalítica o autocatalítica del propéptido del propolipéptido. La secuencia codificante del propéptido se puede obtener a partir de los genes de proteasa alcalina (*aprE*) de *Bacillus subtilis*, proteasa neutra (*nprT*) de *Bacillus subtilis*, *lacasa* (WO 95/33836) de *Myceliophthora thermophila*, proteasa aspártica de *Rhizomucor miehei* y factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*

10 [0170] Cuando las secuencias de péptido señal y propéptido están presentes en el N-terminal de un polipéptido, la secuencia de propéptido se sitúa junto al N-terminal de un polipéptido y la secuencia de péptido señal se sitúa junto al N-terminal de la secuencia de propéptido.

15 [0171] También puede ser deseable añadir secuencias reguladoras que permitan la regulación de la expresión del polipéptido en relación con el crecimiento de la célula huésped. Ejemplos de sistemas reguladores son aquellos que hacen que la expresión del gen sea activada o desactivada en respuesta a un estímulo físico o químico, incluyendo la presencia de un compuesto regulador. Los sistemas reguladores de los sistemas procariotas incluyen los sistemas de operadores *lac*, *tac*, y *trp*. En levaduras, se puede usar el sistema ADH2 o el sistema GAL1. En hongos filamentosos, se pueden usar la glucoamilasa de *Aspergillus niger*, la TAKA alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae* promotor, y glucoamilasa de *Aspergillus oryzae*. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son aquellos que permiten la amplificación génica. En los sistemas eucariotas, estas secuencias reguladoras incluyen el gen de la 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 estaría operativamente enlazado a la secuencia reguladora.

30 Vectores de expresión

[0172] 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 diversas secuencias de nucleótidos y de control pueden unirse 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 dichos sitios. Alternativamente, el polinucleótido puede expresarse insertando el 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 ubica en el vector de modo que la secuencia codificante esté operativamente enlazada con las secuencias de control apropiadas para la expresión.

40 [0173] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (*p. ej.*, un plásmido o un virus) que puede someterse convenientemente a procedimientos de ADN recombinante y puede producir la expresión del polinucleótido. La elección del vector dependerá típicamente de la compatibilidad del vector con la célula huésped en la que se va a introducir el vector. El vector puede ser un plásmido lineal o circular cerrado.

45 [0174] 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, *p. ej.*, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para garantizar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser tal que, cuando se introduce en la célula huésped, está integrado en el genoma y se repite junto con el(los) cromosoma(s) en el(los) que ha sido integrado. Además, se puede usar un único vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ADN total que se introducirá en el genoma de la célula huésped, o un transposón.

55 [0175] El vector contiene preferiblemente uno o más (varios) marcadores seleccionables que permiten una fácil selección 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 similares.

60 [0176] Ejemplos de marcadores bacterianos seleccionables son los genes *dal* de *Bacillus subtilis* o *Bacillus licheniformis*, o marcadores que confieren resistencia a antibióticos tales como resistencia a ampicilina, cloranfenicol, kanamicina o tetraciclina. Marcadores adecuados para células huésped de levadura son ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 y URA3. Los marcadores seleccionables para usar en una célula huésped fúngica filamentosos incluyen, pero no se limitan a, *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina carbamoiltransferasa), *bar* (fosfinotricina acetiltransferasa), *hph* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrato reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato descarboxilasa), *sC* (sulfato adeniltransferasa), y *trpC* (antranilato sintasa), así como

equivalentes de los mismos. Se prefiere para su uso en una célula de *Aspergillus* los genes *amdS* y *pyrG* de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y el gen *bar* de *Streptomyces hygrosopicus*.

5 **[0177]** El vector contiene preferiblemente un elemento o elementos que permiten la integración del vector en el genoma de la célula huésped o la replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.

10 **[0178]** Para la integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede basarse en la secuencia del polinucleótido que codifica el polipéptido o cualquier otro elemento del vector para su integración en el genoma mediante recombinación homóloga o no homóloga. Alternativamente, el vector puede contener polinucleótidos adicionales para dirigir la integración mediante recombinación homóloga en el genoma de la célula huésped en una o varias ubicaciones precisas en el(los) cromosoma(s). Para aumentar la probabilidad de integración en un lugar preciso, los elementos de integración deben contener un número suficiente de ácidos nucleicos, tales como de 100 a 10 000 pares de bases, de 400 a 10 000 pares de bases y de 800 a 15 10.000 pares de bases, que tienen un alto grado de identidad de secuencia con la secuencia diana correspondiente para aumentar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos de integración pueden ser cualquier secuencia que sea homóloga a la secuencia diana en el genoma de la célula huésped. Además, los elementos de integración pueden ser polinucleótidos no codificantes o codificantes. Por otra parte, el vector puede integrarse en el genoma de la célula huésped mediante recombinación no homóloga.

20 **[0179]** Para una replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación que permita al vector replicarse de forma autónoma en la célula huésped en cuestión. El origen de replicación puede ser cualquier replicador de 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*.

25 **[0180]** Ejemplos de orígenes bacterianos de replicación son los orígenes de la replicación de los plásmidos pBR322, pUC19, pACYC177 y pACYC184 que permiten la replicación en *E coli*, y pUB110, pE194, pTA1060 y pAMB1 que permiten la replicación en *Bacillus*.

30 **[0181]** Ejemplos de orígenes de replicación para usar en una célula huésped de levadura son el origen de replicación de 2 micras, el ARS1, el ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3 y la combinación de ARS4 y CEN6.

35 **[0182]** 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). El aislamiento del gen AMA1 y la construcción de plásmidos o vectores que comprenden el gen pueden realizarse de acuerdo con los métodos descritos en WO 00/24883.

40 **[0183]** Se puede insertar más de una copia de un polinucleótido de la presente invención en una célula huésped para aumentar la producción de un polipéptido. Se puede obtener un aumento en el número de copias del polinucleótido integrando al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped o incluyendo un gen marcador seleccionable amplificable con el polinucleótido donde las células que contienen copias amplificadas del gen marcador seleccionable y por lo tanto copias adicionales del polinucleótido, se pueden seleccionar cultivando las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

45 **[0184]** Los procedimientos usados para ligar los elementos descritos anteriormente para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención son bien conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

50 **Células huésped**

[0185] La presente invención también se refiere a células huésped recombinantes, que comprenden un polinucleótido de la presente invención operativamente enlazado a una o más (varias) 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 manera que el constructo o vector se mantiene como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico autorreplicante como se ha descrito anteriormente. El término "célula huésped" abarca cualquier descendiente de una célula madre que no es idéntico a la célula madre debido a mutaciones que se producen durante la replicación. La elección de una célula huésped dependerá en gran medida del gen que codifica el polipéptido y su fuente.

60 **[0186]** 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.

65 **[0187]** La célula huésped procariótica puede ser cualquier bacteria gram-positiva o gram-negativa. Las bacterias gram-positivas incluyen, pero no se limitan a, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Clostridium*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Paenibacillus* y *Streptomyces*. Las bacterias gram-negativas incluyen, pero no se

limitan a *E coli* y *Pseudomonas*.

[0188] La célula huésped bacteriana puede ser cualquier célula de *Vacillales* incluyendo, pero sin limitarse a, células de *Bacillus amyloliquefancensis*, *Brevibacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*. Una célula huésped específicamente preferida es una célula de *Bacillus lentus*.

[0189] La célula huésped bacteriana puede ser también cualquier célula de *Streptomyces* incluyendo, pero sin limitarse a, células de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus*, y *Streptomyces lividans*.

[0190] La introducción del ADN en una célula de *Bacillus* puede, por ejemplo, efectuarse mediante transformación de protoplastos (véase, *p. ej.*, Chang y Cohen, 1979, *Mol. Gen. Genet.* 168:111-115), utilizando células competentes (véase, *p. ej.*, Young y Spizizen, 1961, *J. Bacteriol.* 81:823-829, o Dubnau y Davidoff-Abelson, 1971, *J. Mol. Biol.* 56:209-221), mediante electroporación (véase, *p. ej.*, Shigekawa y Dower, 1988, *Biotechniques* 6: 742 - 751), o mediante conjugación (véase, *p. ej.*, Koehler y Thorne, 1987, *J. Bacteriol.* 169:5271-5278). La introducción del ADN en una célula de *E. coli* puede, por ejemplo, efectuarse mediante transformación de protoplastos (véase, *p. ej.*, Hanahan, 1983, *J. Mol. Biol.* 166:557-580) o electroporación (véase, *p. ej.*, Dower et al., 1988, *Nucleic Acids Res.* 16:6127-6145). La introducción del ADN en una célula de *Streptomyces* puede efectuarse, por ejemplo, mediante transformación de protoplastos y electroporación (véase, *p. ej.*, Gong et al., 2004, *Folia Microbiol. (Praha)* 49: 399 - 405), mediante conjugación (véase, *p. ej.*, Mazodier et al., 1989, *J. Bacteriol.* 171:3583-3585) o mediante transducción (véase, *p. ej.*, Burke et al., 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 98: 6289 - 6 294). La introducción del ADN en una célula de *Pseudomonas* puede, por ejemplo, efectuarse mediante electroporación (véase, *p. ej.*, Choi et al., 2006, *J. Microbiol. Methods* 64: 391 - 397), o mediante conjugación (véase, *p. ej.*, Pinedo y Smets, 2005, *Appl. Environ. Microbiol.* 71:51-57). La introducción del ADN en una célula de *Streptococo* puede, por ejemplo, efectuarse mediante competencia natural (véase, *p. ej.*, Perry y Kuramitsu, 1981, *Infect. Immun.* 32:1295-1297), mediante transformación de protoplastos (véase, *p. ej.*, Catt y Jollick, 1991, *Microbios* 68: 189-207, mediante electroporación (véase, *p. ej.*, Buckley et al., 1999, *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3800-3804) o mediante conjugación (véase, *p. ej.*, Clewell, 1981, *Microbiol. Rev.* 45:409-436). Sin embargo, puede usarse cualquier método conocido en la técnica para introducir ADN en una célula huésped.

[0191] La célula huésped también puede ser un eucariota, tal como una célula de mamífero, insecto, planta u hongo.

[0192] La célula huésped puede ser una célula fúngica. "Hongos", tal como se usa en el presente documento, incluye los fila Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota y Zygomycota (como se define en Hawksworth et al., In, Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8ª edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, Reino Unido) así como los Oomycota (como se cita en Hawksworth et al., 1995, *supra*, página 171) y todos los hongos mitospóricos (Hawksworth et al., 1995, *supra*).

[0193] La célula huésped fúngica puede ser una célula de levadura. "Levadura", tal como se usa en este documento, incluye levadura ascoesporógena (Endomycetales), levadura basidioesporógena y levadura perteneciente a los Fungi Imperfecti (Blastomycetes). Dado que la clasificación de la levadura puede cambiar en el futuro, para los propósitos de esta invención, la levadura se definirá como se describe en *Biology and Activities of Yeast* (Skinner, F.A., Passmore, S.M., y Davenport, R.R., eds, Soc. App. Bacteriol. Serie de Simposios N.º 9, 1980).

[0194] 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*.

[0195] La célula huésped fúngica puede ser una célula fúngica filamentosa. Los "hongos filamentosos" incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycota y Oomycota (como se define en Hawksworth et al., 1995, *supra*). Los hongos filamentosos se caracterizan generalmente por una pared micelial compuesta de quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo es por alargamiento hifal y el catabolismo de carbono es obligatoriamente aeróbico. Por el contrario, el crecimiento vegetativo por levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* es mediante injerto de un talo unicelular y el catabolismo de carbono puede ser fermentativo.

[0196] 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.

[0197] 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 subvermispora*, *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 sarcochromum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecloides*, *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*.

[0198] Las células fúngicas pueden transformarse mediante un proceso que implica la formación de protoplastos, la transformación de los protoplastos y la regeneración de la pared celular de una manera conocida *per se*. Procedimientos adecuados para la transformación de células huésped de *Aspergillus* y *Trichoderma* se describen en EP 238023 y Yelton et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 81: 1470-1474. Los métodos adecuados para transformar la especie *Fusarium* se describen en Malardier et al., 1989, Gene 78: 147-156 y WO 96/00787. La levadura puede transformarse usando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, In Abelson, J.N. y Simon, M.I., editores, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Volumen 194, páginas 182-187, Academic Press, Inc., Nueva York; Ito et al., 1983, J. Bacteriol. 153:163; y Hinnen et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 75: 1920.

Métodos de Producción

[0199] La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención, que comprenden: (a) cultivar una célula que, en su forma de tipo salvaje, produce el polipéptido, bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido. En un aspecto, la célula es del género *Saccharopolyspora*. En un aspecto más preferido, la célula es una célula de *Saccharopolyspora erythraea*.

[0200] El ADN cromosómico de *Saccharopolyspora erythraea* puede aislarse como se indica en Olynyk y col.; Complete genome sequence of the erythromycin-producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea* NRRL23338. Nat Biotechnol 25: 447 - 453 (2007). Este ADN puede usarse para la producción recombinante de una proteasa que se va a usar de acuerdo con la invención.

[0201] La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención, que comprenden: (a) cultivar una célula huésped recombinante de la presente invención bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido.

[0202] Las células huésped se cultivan en un medio nutriente adecuado para la producción del polipéptido usando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula puede cultivarse mediante cultivo en matraz de agitación y fermentaciones a pequeña o gran escala (incluyendo fermentaciones continuas, por lote, por lote alimentado o de estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales realizadas en un medio adecuado y bajo condiciones que permiten que el polipéptido sea expresado y/o aislado. El cultivo tiene lugar en un medio nutriente adecuado que comprende fuentes de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Los medios adecuados están disponibles en los proveedores comerciales o pueden prepararse de acuerdo con las composiciones publicadas (*p. ej.*, en los catálogos de la American Type Culture Collection). Si el polipéptido se secreta en el medio nutriente, puede recuperarse directamente del medio. Si el polipéptido no se secreta, puede recuperarse de los lisados celulares.

[0203] Se proporcionan más detalles en las secciones anteriores y en la sección sobre "Constructos de ácidos nucleicos, vectores de expresión, células huésped recombinantes y métodos para la producción de proteasas" a continuación.

[0204] El polipéptido se puede detectar usando métodos conocidos en la técnica que son específicos para los polipéptidos. Estos métodos de detección pueden incluir el uso de anticuerpos específicos, la formación de un producto enzimático o la desaparición de un sustrato enzimático. Por ejemplo, se puede usar un ensayo enzimático para determinar la actividad del polipéptido.

[0205] El polipéptido puede recuperarse usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido puede recuperarse del medio nutriente mediante procedimientos convencionales incluyendo, pero sin limitarse a, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación.

5 **[0206]** El polipéptido puede purificarse mediante una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, cromatografía (*p. ej.*, intercambio de iones, afinidad, hidrofobia, cromatofoco y exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (*p. ej.*, enfoque isoelectrico preparativo), solubilidad diferencial (*p. ej.*, precipitado de sulfato de amonio), SDS-PAGE o extracción (véase, *p. ej.*, Protein Purification, J.-C. Janson y Lars Ryden, editores, VCH Publishers, Nueva York, 1989) para
10 obtener polipéptidos sustancialmente puros.

[0207] En un aspecto alternativo, el polipéptido no se recupera, sino que se utiliza como fuente del polipéptido una célula huésped de la presente invención que expresa un polipéptido.

15 **Plantas**

[0208] La presente invención también se refiere a plantas, *p. ej.*, una planta transgénica, una parte de planta o una célula vegetal, que comprende un polinucleótido aislado de la presente invención para expresar y producir el polipéptido en cantidades recuperables. El polipéptido puede recuperarse de la planta o de la
20 parte de la planta. Alternativamente, la planta o parte de planta que contiene el polipéptido se puede usar como tal para mejorar la calidad de alimentos o piensos, *p. ej.*, mejorando el valor nutricional, la palatabilidad y las propiedades reológicas, o destruir un factor antinutritivo.

[0209] La planta transgénica puede ser dicotiledónea o monocotiledónea. Ejemplos de plantas monocotiledóneas son las gramíneas, tales como *poa pratense* (hierba azul, *poa*), hierba forrajera tal como *Festuca*, *Lolium*, hierba templada, tal como *Agrostis*, y cereales, *p. ej.*, trigo, avena, centeno, cebada, arroz, sorgo y maíz.

[0210] Ejemplos de plantas dicotiledóneas son el tabaco, las leguminosas, como los altramuces, la patata, la remolacha azucarera, el guisante, las judías y la semilla de soja; y las plantas crucíferas (familia Brassicaceae), como la coliflor, la semilla de colza y el organismo modelo estrechamente relacionado de *Arabidopsis thaliana*.

[0211] Ejemplos de partes de planta son tallo, callo, hojas, raíz, frutos, semillas y tubérculos, así como los tejidos individuales que comprenden estas partes, *p. ej.*, epidermis, mesófilo, parénquima, tejidos vasculares y meristemas. Los compartimentos específicos de células vegetales, tales como cloroplastos, apoplastos, mitocondrias, vacuolas, peroxisomas y citoplasma, también se consideran parte de una planta. Además, cualquier célula vegetal, independientemente del origen del tejido, se considera una parte de la planta. Igualmente, partes de plantas tales como tejidos específicos y células aisladas para facilitar la utilización de la
40 invención también se consideran partes de plantas, *p. ej.*, embriones, endospermos, aleurona y tegumentos.

[0212] También se incluyen dentro del alcance de la presente invención los descendientes de tales plantas, partes de plantas y células vegetales.

45 **[0213]** La planta transgénica o célula vegetal que expresa un polipéptido puede construirse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. En resumen, la célula vegetal o planta se construye incorporando una o más (varios) constructos de expresión que codifican un polipéptido en el genoma huésped de la planta o el genoma del cloroplasto y propagando la planta o célula vegetal modificada resultante a una planta o célula vegetal transgénica.

50 **[0214]** 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 elegida. Además, el constructo de expresión puede comprender un marcador seleccionable útil para identificar células huésped en las que se ha integrado el constructo de expresión, y las secuencias de ADN necesarias para la introducción del constructo en la planta en cuestión (esta última depende del método de introducción de ADN a utilizar).

60 **[0215]** La elección de secuencias reguladoras, tales como secuencias promotoras y terminadoras y opcionalmente secuencias de señal o tránsito, se determina, por ejemplo, basándose en cuándo, dónde y cómo se desea expresar el polipéptido. Por ejemplo, la expresión del gen que codifica un polipéptido puede ser constitutiva o inducible, o puede ser específica de desarrollo, fase o tejido, y el producto genético puede ser dirigido a un tejido o parte de planta específicos tales como semillas u hojas. Las secuencias reguladoras son, por ejemplo, descritas por Tague et al., 1988, *Plant Physiology* 86: 506.

65 **[0216]** Para expresión constitutiva, se pueden usar los promotores 35S-CaMV, ubiquitina 1 de maíz y actina 1

de arroz (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). Los promotores específicos de órgano pueden ser, por ejemplo, un promotor de tejidos sumidero de almacenamiento tales como semillas, tubérculos de patata y frutos (Edwards y Coruzzi, 1990, Ann. Rev. Genet. 24:275-303), o de tejidos sumideros metabólicos (por ejemplo, meristemas) (Ito et al., 1994, Plant Mol. Biol. 24:863-878), un promotor específico de semilla tal como los promotores de glutelina, prolamina, globulina o albúmina del arroz (Wu et al., 1998, Plant Cell Physiol. 39:885-889), un promotor de *Vicia faba* de la legumina B4 y el gen de la proteína de semilla desconocida de *Vicia faba* (Conrad et al., 1998, J. Plant Physiol. 152:708-711), un promotor de una proteína de cuerpo aceitoso de semilla (Chen et al., 1998, Plant Cell Physiol. 39:935-941), el promotor de la proteína de almacenamiento *napA* de *Brassica napus*, o cualquier otro promotor específico semilla conocido en la técnica, *p. ej.*, tal como se describe en WO 91/14772. Además, el promotor puede ser un promotor específico de hoja tal como el promotor *rbcS* del arroz o del tomate (Koyozuka et al., 1993, Plant Physiol. 102:991-1000), el promotor del gen de la adenina metiltransferasa del virus de la chlorella (Mitra y Higgins, 1994, Plant Mol. Biol. 26:85-93), el promotor del gen *aldP* del arroz (Kagaya et al., 1995, Mol. Gen. Genet. 248:668-674), o un promotor inducible por herida tal como el promotor *pin2* de la patata (Xu et al., 1993, Plant Mol. Biol. 22:573-588). Del mismo modo, el promotor puede ser inducible por tratamientos abióticos tales como temperatura, sequía o alteraciones en la salinidad, o inducido por sustancias aplicadas exógenamente que activan el promotor, *p. ej.*, etanol, estrógenos, hormonas vegetales tales como etileno, ácido abscísico y ácido giberélico, y metales pesados.

[0217] También se puede usar un elemento potenciador del promotor para conseguir una expresión más alta de un polipéptido en la planta. Por ejemplo, el elemento potenciador del promotor puede ser un intrón que se coloca entre el promotor y el polinucleótido que codifica un polipéptido. Por ejemplo, Xu *et al.*, 1993, *supra*, describen el uso del primer intrón del gen de la actina 1 del arroz para potenciar la expresión.

[0218] El gen marcador seleccionable y cualquier otra parte del constructo de expresión puede elegirse entre los disponibles en la técnica.

[0219] La construcción de ácido nucleico se incorpora al genoma de la planta de acuerdo con técnicas convencionales conocidas en la técnica, incluyendo la transformación mediada por *Agrobacterium*, la transformación mediada por virus, la microinyección, el bombardeo de partículas, la transformación biolística y la electroporación (Gasser et al., 1990, Science 244: 1293; Potrykus, 1990, Bio/Technology 8: 535; Shimamoto et al., 1989, Nature 338: 274).

[0220] Actualmente, la transferencia de genes mediada por *Agrobacterium tumefaciens* el método elegido para generar dicotiledóneas transgénicas (para revisión, véase Hooykas y Schilperoort, 1992, Plant Mol. Biol. 19:15-38) y también se pueden utilizar para transformar monocotiledóneas, aunque a menudo se usan otros métodos de transformación para estas plantas. En la actualidad, el método elegido para generar monocotiledóneas transgénicas es el bombardeo de partículas (partículas microscópicas de oro o de tungsteno recubiertas con el ADN transformante) de callos embrionarios 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 la transformación de monocotiledóneas se basa en la transformación de protoplastos como describen Omirulleh et al., 1993, Plant Mol. Biol. 21:415-428. Métodos de transformación adicionales para usar de acuerdo con la presente descripción incluyen los descritos en patente EE. UU. n.ºs 6.395.966 y 7.151.204.

[0221] Después de la transformación, los transformantes que han incorporado el constructo de expresión se seleccionan y regeneran en plantas enteras de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. A menudo, el procedimiento de transformación está diseñado para la eliminación selectiva de genes de selección durante la regeneración o en las siguientes generaciones usando, por ejemplo, cotransformación con dos constructos de ADN-T separados o escisión específica del sitio del gen de selección mediante una recombinasa específica.

[0222] Además de la transformación directa de un genotipo de planta particular con un constructo preparado de acuerdo con la presente invención, las plantas transgénicas pueden hacerse 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 vegetal particular por cruzamiento, sin necesidad de transformar directamente una planta de esa variedad dada. Por lo tanto, la presente invención abarca no sólo una planta directamente regenerada a partir de células que han sido transformadas de acuerdo con la presente invención, sino también los descendientes de dichas plantas. Tal como se usa en el presente documento, descendiente puede referirse a la descendencia de cualquier generación de una planta original preparada de acuerdo con la presente invención. Dicho descendiente puede incluir un constructo de ADN preparado de acuerdo con la presente invención, o una porción de un constructo de ADN preparada de acuerdo con la presente invención. El cruce resulta en la introducción de un transgén en una línea de plantas mediante la polinización cruzada de una línea de partida con una línea de planta donadora. Ejemplos no limitantes de tales pasos se articulan además en patente EE. UU. n.º 7.151.204.

[0223] Las plantas pueden generarse mediante un proceso de conversión de retrocruzamiento. Por ejemplo, las plantas incluyen plantas a las que se hace referencia como genotipo, línea, endogámica o híbrido convertidas por retrocruzamiento.

[0224] Se pueden usar marcadores genéticos para ayudar en la introgresión de uno o más transgenes de la invención de un antecedente genético a otro. La selección asistida por marcadores ofrece ventajas en relación con la reproducción convencional, ya que puede usarse para evitar errores causados por variaciones fenotípicas. Además, los marcadores genéticos pueden proporcionar datos relativos al grado relativo de germoplasma élite en los descendientes individuales de un cruce particular. Por ejemplo, cuando una planta con un rasgo deseado que por otro lado tiene un antecedente genético no deseable agrónomicamente se cruza con un origen de élite, se pueden usar marcadores genéticos para seleccionar descendientes que no sólo posean el rasgo de interés, sino que también tengan una proporción relativamente grande del germoplasma deseado. De esta manera, se minimiza el número de generaciones requeridas para la introgresión de uno o más rasgos en un antecedente genético particular.

[0225] La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención, que comprenden: (a) cultivar una planta transgénica o una célula vegetal que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido bajo condiciones que conducen a la producción del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido.

Composiciones

[0226] La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden una proteasa de la presente invención. Preferiblemente, las composiciones están enriquecidas en dicha proteasa. El término "enriquecido" indica que la actividad proteasa de la composición se ha incrementado, *p. ej.*, con un factor de enriquecimiento de al menos 1,1.

[0227] La composición puede comprender una proteasa de la presente invención como el componente enzimático principal, *p. ej.*, una composición monocomponente. Alternativamente, la composición puede comprender múltiples actividades enzimáticas, tales como aminopeptidasa, amilasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celulasa, quitinasa, cutinasa, ciclodextrina glucosiltransferasa, desoxirribonucleasa, 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 xilanasasa. La(s) enzima(s) adicional(es) puede(n) ser producidas, por ejemplo, por microorganismos tales como bacterias u hongos, por plantas o por animales. Las composiciones se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos en la técnica y pueden estar en forma de composición líquida o seca. Por ejemplo, la composición puede estar en forma de un granulado o un microgranulado. La proteasa puede estabilizarse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica.

Usos

[0228] La presente invención se dirige a métodos para usar los polipéptidos que tienen actividad de proteasa, o composiciones de los mismos.

Pensos para animales

[0229] La presente invención se refiere a métodos para usar las proteasas que tienen actividad de proteasa en piensos para animales, así como a composiciones y aditivos de piensos que comprenden las proteasas de la invención.

[0230] El término animal incluye todos los animales, incluidos los seres humanos. Ejemplos de animales son los rumiantes y los no rumiantes. Los animales rumiantes incluyen, por ejemplo, animales tales como ovejas, cabras y ganado, *p. ej.*, ganado vacuno, vacas y terneros jóvenes. En una realización particular, el animal es un animal no rumiante. Los animales no rumiantes incluyen animales monogástricos, *p. ej.*, cerdos o ganado porcino (incluyendo, entre otros, lechones, cerdos en crecimiento y cerdas); aves de corral tales como pavos, patos y pollos (incluyendo, pero sin limitarse a, pollos de engorde, ponedoras); caballos (incluyendo pero sin limitarse a, sangre caliente, sangre fría y sangre templada), terneros jóvenes; y peces (incluyendo, pero sin limitarse a, salmón, trucha, tilapia, bagre y carpas); y crustáceos (incluyendo, pero sin limitarse a, gambas y langostinos).

[0231] El término pienso o composición de pienso significa cualquier compuesto, preparado, mezcla o composición adecuada o pensada para ser ingerida por un animal.

[0232] En el uso según la invención, se puede alimentar al animal con la proteasa antes, después o

simultáneamente a la dieta. Esta última es la opción preferida.

- 5 **[0233]** En una realización particular, la proteasa está bien definida en la forma en la que se añade al pienso, o cuando se incluye en un aditivo para piensos. Bien definido significa que el preparado de proteasa es al menos un 50 % puro según la determinación mediante cromatografía de exclusión de tamaño (véase el ejemplo 12 de WO 01/58275). En otras formas de realización particulares, el preparado de proteasa es al menos un 60, 70, 80, 85, 88, 90, 92, 94, o al menos un 95 % pura según la determinación mediante este método.
- 10 **[0234]** Una preparación de proteasa bien definida es beneficiosa. Por ejemplo, es mucho más fácil dosificar correctamente en el pienso una proteasa que está esencialmente libre de interferir o contaminar otras proteasas. El término dosificar correctamente se refiere en particular al objetivo de obtener resultados consistentes y constantes, y a la capacidad de optimizar la dosificación basándose en el efecto deseado.
- 15 **[0235]** Sin embargo, para el uso en piensos para animales, la proteasa no necesita ser tan pura; puede, p. ej., incluir otras enzimas, en cuyo caso podría denominarse preparado de proteasa.
- 20 **[0236]** El preparado de proteasa puede (a) añadirse directamente al pienso (o utilizarse directamente en un proceso de tratamiento de proteínas), o (b) puede utilizarse en la producción de una o más composiciones intermedias tales como aditivos para piensos o premezclas que posteriormente se añaden al pienso (o se utilizan en un proceso de tratamiento). El grado de pureza descrito anteriormente se refiere a la pureza del preparado de proteasa original, usada de acuerdo ya sea con (a) o con (b) antes mencionados.
- 25 **[0237]** Los preparados de proteasa con purezas de este orden de magnitud se pueden obtener en particular utilizando métodos de producción recombinantes, mientras que, cuando la proteasa se produce mediante métodos de fermentación tradicionales, no se obtienen tan fácilmente y también están sujetos a una variación mucho más alta entre un lote y otro.
- 30 **[0238]** Naturalmente, tal preparación de proteasa puede mezclarse con otras enzimas.
- [0239]** La proteína puede ser una proteína animal, tal como harina de carne y hueso, harina de plumas y/o harina de pescado; o puede ser una proteína vegetal.
- 35 **[0240]** El término proteínas vegetales tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier compuesto, composición, preparado o mezcla que incluye al menos una proteína que se deriva o se origina a partir de un vegetal, incluyendo proteínas modificadas y derivados de proteínas. En formas de realización particulares, el contenido de proteínas de las proteínas vegetales es de al menos un 10, 20, 30, 40, 50, o 60 % (p/p).
- 40 **[0241]** Las proteínas vegetales pueden derivarse de fuentes de proteínas vegetales, tales como legumbres y cereales, por ejemplo, materiales de las plantas de las familias *Fabaceae* (*Leguminosae*), *Cruciferaeae*, *Chenopodiaceae* y *Poaceae*, como harina de soja, harina de altramuz y harina de colza.
- 45 **[0242]** En una realización particular, la fuente de proteína vegetal es el material de una o más plantas de la familia *Fabaceae*, p. ej., soja, altramuz, guisante o judía.
- [0243]** En otra realización particular, la fuente de proteína vegetal es el material de una o más plantas de la familia *Chenopodiaceae*, p. ej., remolacha, remolacha azucarera, espinaca o quinoa.
- 50 **[0244]** Otros ejemplos de fuentes de proteínas vegetales son la colza, la semilla de girasol, la semilla de algodón y la col.
- [0245]** La soja es una fuente de proteína vegetal preferida.
- 55 **[0246]** Otros ejemplos de fuentes de proteínas vegetales son cereales tales como cebada, trigo, centeno, avena, maíz, arroz, triticale y sorgo.
- 60 **[0247]** En una realización particular de un proceso de tratamiento, la(s) proteasa(s) en cuestión afecta(n) (o actúa(n) sobre, o ejerce(n) su influencia hidrolizante o degradante sobre) las proteínas, tales como proteínas vegetales o fuentes de proteínas. Para conseguir esto, la proteína o fuente de proteínas es suspendida típicamente en un disolvente, por ejemplo, un disolvente acuoso como el agua, y los valores de pH y temperatura se ajustan teniendo en cuenta las características de la enzima en cuestión. Por ejemplo, el tratamiento puede tener lugar a un valor de pH al cual la actividad de la proteasa real es al menos de un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o al menos un 90%. Igualmente, por ejemplo, el
- 65 **[0247]** tratamiento puede tener lugar a una temperatura a la cual la actividad de la proteasa real es al menos de un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o al menos un 90%. Las indicaciones de porcentaje de

actividad anteriores son relativas a las actividades máximas. La reacción enzimática continúa hasta que se alcanza el resultado deseado, después de lo cual puede o no interrumpirse inactivando la enzima, p. ej., mediante una etapa de tratamiento térmico.

5 **[0248]** En otra realización particular de un proceso de tratamiento de la invención, la acción de la proteasa es sostenida, lo que quiere decir, p. ej., que la proteasa se agrega a las proteínas, pero su influencia hidrolizante, por decirlo así, no se activa hasta que se desee en un momento posterior, una vez que se establecen las condiciones de hidrolización adecuadas, o una vez que se inactivan los inhibidores enzimáticos, o cualquier otro medio que podría haber sido aplicado para posponer la acción de la enzima.

10 **[0249]** En una realización, el tratamiento es un pretratamiento de piensos para animales o proteínas para usar en piensos para animales, es decir, las proteínas se hidrolizan antes de la ingesta.

15 **[0250]** La expresión "mejorar el valor nutricional de un pienso para animales" significa mejorar la disponibilidad de nutrientes en el pienso. En esta invención, mejorar los valores nutricionales se refiere en particular a mejorar la disponibilidad de la fracción proteica del pienso, conduciendo de este modo a una extracción de proteínas aumentada, a mayores rendimientos de proteína y/o una utilización mejorada de la proteína. Cuando se incrementa el valor nutritivo del pienso, se incrementa la digestibilidad de proteínas y/o aminoácidos y se incrementa la tasa de crecimiento, y/o el aumento de peso y/o la conversión alimenticia (es decir, el peso del pienso ingerido en relación con la ganancia de peso) del animal pueden mejorarse.

20 **[0251]** La proteasa se puede añadir al pienso en cualquier forma, ya sea como una proteasa relativamente pura o en mezcla con otros componentes destinados a su adición al pienso para animales, es decir, en forma de aditivos de piensos para animales, tales como las llamadas premezclas.

25 **[0252]** En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a composiciones para usar en piensos para animales, tales como piensos para animales y aditivos de piensos para animales, p. ej., premezclas

30 **[0253]** Además de la proteasa de la invención, los aditivos en piensos para animales de la invención contienen al menos una vitamina liposoluble, y/o al menos una vitamina hidrosoluble, y/o al menos un oligoelemento, y/o al menos un macromineral.

35 **[0254]** Además, ingredientes opcionales de aditivos para piensos son agentes colorantes, p. ej., carotenoides tales como betacaroteno, astaxantina y luteína; estabilizadores; aditivos que mejoran el crecimiento y compuestos aromatizantes/condimentos, p. ej., creosol, anetol, deca-, undeca- y/o dodeca-lactonas, iononas, irona, gingerol, piperidina, propilideno ftalida, butilideno ftalida, capsaicina y/o tanino; péptidos antimicrobianos; ácidos grasos poliinsaturados (AGPI); especies reactivas que generan oxígeno; también se puede usar un soporte que puede contener, por ejemplo, un 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 caliza, 1-3 % en peso de una goma, tal como goma arábiga, 5-50 % en peso de azúcar y/o almidón, y 5-15 % en peso de agua.

40 **[0255]** Un pienso o un aditivo de pienso de la invención también puede comprender al menos otra enzima seleccionada de entre la fitasa (EC 3.1.3.8 o 3.1.3.26); xilanasa (EC 3.2.1.8); galactanasa (EC 3.2.1.89); alfa-galactosidasa (EC 3.2.1.22); 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).

45 **[0256]** En una realización particular estas otras enzimas están bien definidas (como se ha definido anteriormente para los preparados de proteasa).

50 **[0257]** Ejemplos de péptidos antimicrobianos (PAM) son CAP18, leucocina A, tritripticina, protegrina-1, tanatina, defensina, lactoferrina, lactoferricina y ovispirinas tales como la Novispirina (Robert Lehrer, 2000), plectasinas y estatinas, incluyendo los compuestos y polipéptidos descritos en WO 03/044049 y WO 03/048148, así como variantes o fragmentos de los anteriores que retienen la actividad antimicrobiana.

55 **[0258]** Ejemplos de polipéptidos antifúngicos (PAF) son los péptidos de *Aspergillus giganteus*, y *Aspergillus niger*, así como variantes y fragmentos de los mismos que retienen actividad antifúngica, tal como se describe en WO 94/01459 y WO 02/090384.

60 **[0259]** Ejemplos de ácidos grasos poliinsaturados son los ácidos C18, C20 y C22, tales como el ácido araquidónico, ácido docosohexaenoico, ácido eicosapentaenoico y ácido gamma-linoleico.

65 **[0260]** Ejemplos de especies que generan oxígeno reactivo son productos químicos tales como perborato, persulfato o percarbonato; y enzimas tales como una oxidasa, una oxigenasa o una sintetasa.

[0261] Generalmente, las vitaminas liposolubles e hidrosolubles, así como los oligoelementos, forman parte de una premezcla destinada a añadirse al pienso, mientras que los macrominerales se añaden por separado al mismo. Cualquiera de estos tipos de composición, cuando está enriquecido con una proteasa de la invención, es un aditivo de piensos para animales de la invención.

[0262] En una realización particular, el aditivo de piensos para animales de la invención está destinado a incluirse (o se ha prescrito que tiene que incluirse) en dietas o piensos para animales en niveles del 0,01 al 10,0 %; más particularmente del 0,05 al 5,0 %; o 0,2 al 1,0 % (% significa g de aditivo por 100 g de pienso). Esto es así en particular para las premezclas.

[0263] Las siguientes son listas no exclusivas de ejemplos de estos componentes:
Ejemplos de vitaminas liposolubles son la vitamina A, la vitamina D3, la vitamina E y la vitamina K, p.ej., la vitamina K3.
Ejemplos de vitaminas hidrosolubles son la vitamina B12, la biotina y la colina, la vitamina B1, la vitamina B2, la vitamina B6, la niacina, el ácido fólico y el pantotenato, p. ej., Ca - D - pantotenato.
Ejemplos de oligoelementos son manganeso, zinc, hierro, cobre, yodo, selenio y cobalto.
Ejemplos de macrominerales son el calcio, el fósforo y el sodio.

[0264] Las necesidades nutricionales de estos componentes (ejemplificado con aves de corral y cochinitos/cerdos) se enumeran en la Tabla A de WO 01/58275. Requisito nutricional significa que estos componentes deben proporcionarse en la dieta en las concentraciones indicadas.

[0265] Alternativamente, el aditivo de piensos para animales 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 entre, uno o más de uno, o dos, o tres, o cuatro y así sucesivamente 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 una cantidad tal que proporcione una concentración en el pienso dentro del intervalo indicado en la columna cuatro, o la columna cinco, o la columna seis de la Tabla A.

[0266] En otra realización adicional, el aditivo de pienso para animales de la invención comprende al menos una de las siguientes vitaminas, preferiblemente para proporcionar una concentración de pienso dentro de los intervalos especificados en la siguiente Tabla 1 (para dietas de lechones y dietas de pollos de engorde, respectivamente).

Tabla 1: Recomendaciones de vitaminas típicas

Vitamina	Dieta de los cochinitos	Dieta del pollo
Vitamina A	10 000-15 000 UI/kg de pienso	8-12.500 UI/kg de pienso
Vitamina D3	1800-2000 UI/kg de pienso	3000-5000 UI/kg de pienso
Vitamina E	60-100 mg/kg de pienso	150-240 mg/kg de pienso
Vitamina K3	24 mg/kg de pienso	24 mg/kg de pienso
Vitamina B1	24 mg/kg de pienso	2-3 mg/kg de pienso
Vitamina B2	6-10 mg/kg de pienso	7-9 mg/kg de pienso
Vitamina B6	4-8 mg/kg de pienso	3-6 mg/kg de pienso
Vitamina B12	00,03 - 0,05 mg/kg de pienso	00,015-0,04 mg/kg de pienso
Niacina (Vitamina B3)	30-50 mg/kg de pienso	50-80 mg/kg de pienso
Ácido pantoténico	20-40 mg/kg de pienso	10-18 mg/kg de pienso
Ácido fólico	1-2 mg/kg de pienso	1-2 mg/kg de pienso
Biotina	00,15 - 0,4 mg/kg de pienso	00,15 - 0,3 mg/kg de pienso
Cloruro de colina	200-400 mg/kg de pienso	300-600 mg/kg de pienso

[0267] La presente invención también se refiere a composiciones de piensos para animales. Las composiciones o dietas de piensos para animales tienen un contenido relativamente alto de proteínas. Las dietas de aves y cerdos pueden caracterizarse como se indica en la Tabla B de WO 01/58275, columnas 2-3. Las dietas de pescado se pueden caracterizar como se indica en la columna 4 de esta Tabla B. Además, tales dietas de pescado usualmente tienen un contenido de grasa bruta de 200-310 g/kg.

[0268] WO 01/58275 corresponde a EE. UU. 09/779334.

[0269] Una composición de pienso para animales de acuerdo con la invención tiene un contenido de proteína bruta de 50-800 g/kg, y además comprende al menos una proteasa tal se reivindica en el presente documento.

- 5 **[0270]** Además, o en forma alternativa (al contenido de proteína bruta indicado anteriormente), la composición del 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.
- 10 **[0271]** En las formas de realización particulares, el contenido de energía metabolizable, proteína bruta, 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).
- 15 **[0272]** La proteína bruta se calcula como nitrógeno (N) multiplicado por un factor 6,25, es decir, Proteína bruta (g/kg) = N (g/kg) x 6,25. El contenido de nitrógeno se determina mediante el método de Kjeldahl (A.O.A.C., 1984, Official Methods of Analysis 14ª ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington DC).
- 20 **[0273]** La energía metabolizable se puede calcular sobre la base de la publicación de la NRC Nutrient requirements in swine, novena edición revisada 1988, subcomité de nutrición porcina, comité de nutrición animal, consejo de agricultura, consejo nacional de investigación. National Academy Press, Washington, D.C., págs. 2-6, y la European Table of Energy Values for Poultry Feed-stuffs, Spelderholt centre for poultry research and extension, 7361 DA Beekbergen, Países Bajos. Grafisch bedrijf Ponsen & looijen bv, Wageningen. ISBN 90-71463-12-5.
- 25 **[0274]** El contenido dietético del calcio, el fósforo y los aminoácidos disponibles en dietas completas de animales se calcula sobre la base de tablas de piensos tales como Veevoedertabel 1997, gegevens over chemische samenstelling, y Central Veevoederbureau, Runderweg 6, 8219 pk Lelystad. ISBN 90-72839-13-7.
- 30 **[0275]** En una realización particular, la composición de piensos para animales de la invención contiene al menos una proteína vegetal tal como se ha definido anteriormente.
- 35 **[0276]** La composición de pienso para animales de la invención también puede contener proteína animal, tal como harina de carne y huesos, harina de plumas y/o harina de pescado, típicamente en una cantidad del 0-25 %. La composición del pienso para animales de la invención puede comprender también gránulos secos de destilería con solubles (DDGS), típicamente en cantidades del 0-30 %.
- 40 **[0277]** Aún en otras formas de realización particulares, la composición de piensos para animales de la invención contiene un 0-80% de maíz; y/o un 0-80% de sorgo; y/o un 0-70% de trigo; y/o un 0-70% de cebada; y/o un 0-30% de avena; y/o un 0-40% de harina de soja; y/o un 0-25% de harina de pescado; y/o un 0-25% de harina de carne y huesos; y/o 0-20% de suero de leche.
- 45 **[0278]** Los piensos para animales pueden, p. ej., fabricarse como piensos en harina (no granulado) o como gránulos. Típicamente, los piensos molidos se mezclan, y se añaden cantidades suficientes de vitaminas y minerales esenciales de acuerdo con las especificaciones para la especie en cuestión. Las enzimas se pueden agregar como formulaciones enzimáticas sólidas o líquidas. Por ejemplo, para piensos en harina se puede añadir una formulación enzimática sólida o líquida antes o durante la etapa de mezcla de ingredientes. Para los piensos en gránulos, el preparado de proteasa/enzimas (líquida o sólida) también se puede añadir antes o durante la etapa de ingredientes del pienso. Típicamente se añade un preparado de proteasa/enzima líquida después de la etapa de formación de gránulos. La enzima también se puede incorporar en un aditivo o premezcla de pienso.
- 50 **[0279]** La concentración final de enzima en la dieta está dentro del intervalo de 0,01 - 200 mg de proteína enzimática por kg de dieta, por ejemplo, en el intervalo de 0,5 - 25 mg de proteína enzimática por kg de dieta animal.
- 55 **[0280]** Naturalmente, la proteasa debe aplicarse en una cantidad eficaz, es decir, en una cantidad adecuada para mejorar la hidrólisis, la digestibilidad y/o el valor nutritivo del pienso. Actualmente se contempla que la enzima se administra en una o más 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 intervalos están en mg de proteasa proteínica por kg de pienso (ppm).
- 60 **[0281]** Para determinar los mg de proteína proteasa por kg de pienso, la proteasa se purifica a partir de la composición del pienso, y la actividad específica de la proteasa purificada se determina usando un ensayo relevante (véase en actividad proteasa, sustratos y ensayos). La actividad de proteasa de la composición de pienso como tal se determina también utilizando el mismo ensayo, y sobre la base de estas dos determinaciones, se calcula la dosificación en mg de proteína proteasa por kg de pienso.
- 65 **[0282]** Los mismos principios se aplican para la determinación de mg de proteína proteasa en aditivos para

piensos. Por supuesto, si se dispone de una muestra de la proteasa utilizada para preparar el aditivo del pienso o el pienso, se determina la actividad específica a partir de esta muestra (no es necesario purificar la proteasa de la composición de pienso o del aditivo).

5 **Composiciones detergentes**

10 **[0283]** En una realización, la invención se refiere a composiciones detergentes que comprenden una enzima de la presente invención en combinación con uno o más componentes adicionales de una composición de limpieza. La elección de componentes adicionales está dentro de la experiencia del especialista e incluye ingredientes convencionales, incluyendo los ejemplos no limitantes de componentes expuestos a continuación.

15 **[0284]** La elección de los componentes puede incluir, para el cuidado del textil, la consideración del tipo de textil que se va a limpiar, el tipo y/o el grado de suciedad, la temperatura a la que se va a limpiar y la formulación del producto detergente. Aunque los componentes mencionados a continuación se clasifican por encabezado general de acuerdo con una funcionalidad particular, esto no debe interpretarse como una limitación puesto que el componente puede tener una o más funcionalidades adicionales que el experto en la técnica apreciará.

20 **[0285]** La composición detergente puede ser adecuada para el lavado de textiles tales como p. ej., tejidos, telas o lino, o para limpiar superficies duras tales como p. ej., suelos, mesas, o para lavavajillas.

Cantidades de enzimas en composiciones detergentes

25 **[0286]** En una realización de la presente invención, el polipéptido de la presente invención puede añadirse a una composición detergente en una cantidad correspondiente a 0,0001-200 mg de proteína enzimática, tal como 0,0005-100 mg de proteína enzimática, preferiblemente 0,001-30 mg de proteína enzimática, más preferiblemente 0,005-8 mg de proteína enzimática, aún más preferiblemente 0,01-2 mg de proteína enzimática por litro de líquido de lavado.

30 **[0287]** Una composición para usar en lavavajillas automáticos (LVA), por ejemplo, puede incluir un 0,0001-50 %, tal como un 0,001 %-20 %, tal como un 0,01 %-10 %, tal como un 0,05-5 % de proteína enzimática en peso de la composición.

35 **[0288]** Una composición para usar en un granulado de lavandería, por ejemplo, puede incluir un 0,0001-50 %, tal como un 0,001 %-20 %, tal como un 0,01 %-10 %, tal como un 0,05 %-5 % de proteína enzimática en peso de la composición.

40 **[0289]** Una composición para usar en un líquido de lavandería, por ejemplo, puede incluir 0,0001 % -10%, tal como 0,001-7 %, tal como 0,1 %-5 % de proteína enzimática en peso de la composición.

45 **[0290]** La(s) enzima(s) de la composición detergente de la invención pueden estabilizarse usando agentes estabilizantes convencionales, p. ej., un poliol tal como propilenglicol o glicerol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico, ácido bórico o un derivado de ácido bórico, p. ej., un éster de borato aromático o un derivado de ácido fenilborónico tal como ácido 4-formilfenilborónico, y la composición puede formularse como se describe en, por ejemplo, WO92/19709 y WO92/19708.

50 **[0291]** En ciertos mercados se utilizan diferentes condiciones de lavado y, como tal, diferentes tipos de detergentes. Esto se describe en EP 1 025 240. Por ejemplo, en Asia (Japón) se utiliza un sistema de concentración baja de detergente, mientras que Estados Unidos usa un sistema de concentración media de detergente y Europa utiliza un sistema de concentración alta de detergente.

55 **[0292]** Un sistema de baja concentración de detergente incluye detergentes donde hay menos de aproximadamente 800 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado. Los detergentes japoneses se consideran típicamente un sistema de concentración baja de detergente, ya que tienen aproximadamente 667 ppm de componentes detergentes presentes en el agua de lavado.

60 **[0293]** Una concentración detergente media incluye detergentes en los que aproximadamente entre 800 ppm y 2000 ppm de componentes detergentes están presentes en el agua de lavado. Los detergentes norteamericanos se consideran generalmente sistemas de concentración media de detergente, ya que tienen aproximadamente 975 ppm de componentes detergentes presentes en el agua de lavado.

65 **[0294]** Un sistema de alta concentración de detergente incluye detergentes en los que hay presentes más de aproximadamente 2000 ppm de componentes detergentes en el agua de lavado. Los detergentes europeos se consideran generalmente sistemas de concentraciones altas de detergente, ya que tienen aproximadamente 4500-5000 ppm de componentes detergentes presentes en el agua de lavado.

[0295] Los detergentes latinoamericanos son generalmente detergentes de alto contenido en fosfatos de espuma y la gama de detergentes utilizados en América Latina puede situarse tanto en las concentraciones medias de detergente como en las altas, ya que van desde 1500 ppm a 6000 ppm de componentes de detergente en el agua de lavado. Tales composiciones detergentes son todas las formas de realización de la invención.

[0296] Un polipéptido de la presente invención también se puede incorporar en las formulaciones detergentes descritas en WO97/07202.

Surfactantes

[0297] La composición detergente puede comprender uno o más surfactantes, que pueden ser aniónicos y/o catiónicos y/o no iónicos y/o semipolares y/o zwitteriónicos, o una mezcla de los mismos. En una realización particular, la composición detergente incluye una mezcla de uno o más surfactantes no iónicos y uno o más surfactantes aniónicos. El(los) surfactante(s) está(n) típicamente presentes a un nivel de aproximadamente un 0,1 % a un 60 % en peso, tal como aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 40 %, o aproximadamente un 3 % a aproximadamente un 20 %, o aproximadamente un 3 % a aproximadamente un 10 %. El(los) surfactante(s) se selecciona(n) basándose en la aplicación de limpieza deseada, e incluye cualquier surfactante convencional conocido en la técnica. Se puede utilizar cualquier surfactante conocido en la técnica para usar en detergentes.

[0298] Cuando se incluye en él, el detergente contendrá normalmente de aproximadamente de un 1 % a aproximadamente un 40 % en peso, tal como de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 30 %, incluyendo de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 15 %, o de aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 25 % de un surfactante. Ejemplos no limitantes de surfactantes aniónicos incluyen sulfatos y sulfonatos, en particular alquilbencenosulfonatos lineales (LAS), isómeros de LAS, alquilbencenosulfonatos ramificados (BABS), fenilalcanosulfonatos, alfa olefín sulfonatos (AOS), olefín sulfonatos, alquenosulfonatos, alcano-2,3-diilbis(sulfatos), hidroxialcanosulfonatos y disulfonatos, sulfatos de alquilo (AS) tales como dodecilsulfato de sodio (SDS), sulfatos de alcohol graso (FAS), sulfatos de alcohol primario (PAS), éter sulfatos de alcohol (AES o AEOS o FES) sulfonatos de parafina (PS), éster sulfonatos, ésteres de glicerol de ácidos grasos sulfonados, ésteres de metilo de ácidos grasos alfa-sulfo (alfa-SFMe o SES) incluyendo éster metílico de sulfonato (MES), ácido alquil- o alqueniilsuccínico, ácido dodecenil/tetradecenilsuccínico (DTSA), derivados de ácidos grasos de aminoácidos, diésteres y monoésteres de ácido sulfo-succínico o jabón y combinaciones de los mismos.

[0299] Cuando se incluye en él, el detergente contendrá normalmente de aproximadamente un 0 % a aproximadamente un 10 % en peso de un surfactante catiónico. Ejemplos no limitantes de surfactantes catiónicos incluyen alquildimetil etanolamina cuat. (ADMEAQ), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), cloruro de dimetildistearilamonio (DSDMAC), y alquilbencildimetilamonio, compuestos de alquilamonio cuaternario, compuestos de amonio cuaternario alcoxlado (AQA) y combinaciones de los mismos.

[0300] Cuando se incluye en él, el detergente contendrá normalmente de aproximadamente un 0,2 % a aproximadamente un 40 % en peso de un surfactante no iónico, por ejemplo de aproximadamente un 0,5 % a aproximadamente un 30 %, en particular de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 20 %, de aproximadamente un 3 % a aproximadamente un 10 %, tal como de aproximadamente un 3 % a aproximadamente un 5 %, o de aproximadamente un 8 % a aproximadamente un 12 %. Ejemplos no limitantes de surfactantes no iónicos incluyen etoxilados de alcohol (AE o AEO), propoxilados de alcohol, alcoholes grasos propoxilados (PFA), ésteres de alquilo de ácidos grasos alcoxlados, tales como ésteres de alquilo de ácidos grasos etoxilados y/o propoxilados, etoxilados de alquilfenoles), etoxilados de nonilfenol (NPE), alquilpoliglucósidos (APG), aminas alcoxladas, monoetanolamidas de ácidos grasos (FAM), dietanolamidas de ácidos grasos (FADA), monoetanolamidas de ácidos grasos etoxilados (EFAM), monoetanolamidas de ácidos grasos propoxilados (PFAM) amidas, o Nacil N(glucamidas, GA, o glucamida de ácidos grasos, FAGA), así como los productos disponibles bajo los nombres comerciales SPAN y TWEEN, y combinaciones de los mismos.

[0301] Cuando se incluye en él, el detergente contendrá normalmente de aproximadamente un 0 % a aproximadamente un 10 % en peso de un surfactante semipolar. Ejemplos no limitantes de surfactantes semipolares incluyen óxidos de amina (AO) tales como alquildimetilamina, N- (coco alquilo) -N,N- óxido de dimetilamina y N-(alquilo de sebo) -N,N-bis (2-hidroxiethyl) amina, alcanolamidas de ácidos grasos y alcanolamidas de ácidos grasos etoxilados, y combinaciones de los mismos.

[0302] Cuando se incluye en él, el detergente contendrá normalmente de aproximadamente un 0 % a aproximadamente un 10 % en peso de un surfactante zwitteriónico. Ejemplos no limitantes de surfactantes zwitteriónicos incluyen betaína, alquildimetilbetaína, sulfobetaina y combinaciones de los mismos.

Hidrotropos

- [0303]** Un hidrotropo es un compuesto que solubiliza compuestos hidrofobos en soluciones acuosas (o de manera opuesta, sustancias polares en un entorno no polar). Típicamente, los hidrotropos tienen un carácter tanto hidrófilo como hidrófobo (las denominadas propiedades anfífilas como se sabe a partir de los surfactantes); sin embargo, la estructura molecular de los hidrotropos generalmente no favorece la autoagregación espontánea, véase p. ej., la reseña de Hodgdon y Kaler (2007), *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 12: 121-128. Los hidrotropos no muestran una concentración crítica por encima de la cual se produce la autoagregación, tal como ocurre para los surfactantes y lípidos que forman mesofases micelares, lamelares o de otro tipo bien definidas. En cambio, muchos hidrotropos muestran un proceso de agregación de tipo continuo donde los tamaños de los agregados crecen a medida que aumenta la concentración. Sin embargo, muchos hidrotropos alteran el comportamiento de la fase, la estabilidad y las propiedades coloidales de los sistemas que contienen sustancias de carácter polar y no polar, incluidas mezclas de agua, aceite, surfactantes y polímeros. Clásicamente, los hidrotropos se utilizan en las industrias desde la farmacéutica, cuidado personal, y alimentaria hasta las aplicaciones técnicas. El uso de hidrotropos en composiciones detergentes permite, por ejemplo, formulaciones más concentradas de surfactantes (como en el proceso de compactación de detergentes líquidos mediante eliminación de agua) sin inducir fenómenos no deseados tales como separación de fases o alta viscosidad.
- [0304]** El detergente puede contener un 0-5 % en peso, como, por ejemplo, aproximadamente de un 0,5 a aproximadamente un 5 % o de aproximadamente 3 % a aproximadamente 5 %, de un hidrotropo. Se puede utilizar cualquier hidrotropo conocido en la técnica para usar en detergentes. Ejemplos no limitantes de hidrotropos incluyen bencenosulfonato de sodio, p-toluenosulfonato de sodio (STS), xilenosulfonato de sodio (SXS), cumenosulfonato de sodio (SCS), cimenosulfonato de sodio, óxidos amínicos, alcoholes y poliglicoléteres, hidroxinaftoato de sodio, hidroxinaftaleno sulfonato de sodio, etilhexil sulfato de sodio y combinaciones de los mismos.

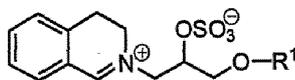
Constructores y coconstructores

- [0305]** La composición detergente puede contener aproximadamente un 0-65 % en peso, como, por ejemplo, aproximadamente de un 5 % a aproximadamente un 45 % de un detergente constructor o coconstructor, o una mezcla de los mismos. En un detergente para lavaplatos, el nivel de aditivo es típicamente un 40-65 %, particularmente un 50-65 %. El constructor y/o coconstructor puede ser particularmente un agente quelante que forma complejos hidrosolubles con Ca y Mg. Se puede utilizar cualquier constructor y/o coconstructor conocido en la técnica para usar en detergentes para la ropa. Ejemplos no limitantes de constructores incluyen zeolitas, difosfatos (pirofosfatos), trifosfatos tales como trifosfato sódico (STP o STPP), carbonatos tales como carbonato de sodio, silicatos solubles tales como metasilicato de sodio, silicatos estratificados (p. ej., SKS-6 de Hoechst), etanolaminas tales como 2-aminoetan-1-ol (MEA), dietanolamina (DEA, también conocida como iminodietanol), trietanolamina (TEA, también conocida como 2,2',2''-nitritrietanol) y carboximetilululina (CMI), y combinaciones de los mismos.
- [0306]** La composición detergente puede contener también un 0-20 % en peso, como, por ejemplo, aproximadamente de un 5 % a aproximadamente un 10% de un coconstructor de detergente, o una mezcla de los mismos. La composición detergente puede incluir un coconstructor solo, o en combinación con un constructor, por ejemplo, un constructor de zeolita. Ejemplos no limitantes de coconstructores incluyen homopolímeros de poli(acrilatos) o copolímeros de los mismos, tales como ácido poli(acrílico) (PAA) o ácido copoli(acrílico/maleico) (PAA/PMA). Otros ejemplos no limitantes incluyen citrato, quelantes tales como aminocarboxilatos, aminopolicarboxilatos y fosfonatos, y ácido alquil- o alqueniilsuccínico. Ejemplos específicos adicionales incluyen ácido 2,2',2''-nitritrietácético (NTA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido iminodisuccínico (IDS), ácido etilendiamina-*N,N*-disuccínico (EDDS), ácido metilglicinacético (MGDA), ácido glutámico - *N,N*-diacético (GLDA), ácido 1-hidroxietano-1,1 difosfónico (HEDP), ácido etilendiaminotetra(metilenofosfónico) (EDTMPA), ácido dietilentriamina pentakis metilenofosfónico (DTPMPA o DTMPA), ácido *N*- (2 - hidroxietil) iminodiacético (EDG), ácido aspártico -*N*-monoacético (ASMA), ácido aspártico - *N,N* - diacético (ASDA), ácido aspártico -*N*- monopropiónico (ASMP), ácido iminodisuccínico (IDA), ácido *N*- (2 - sulfometil) - aspártico (SMAS), ácido *N*- (2 - sulfoetil) - aspártico (SEAS), ácido *N*- (2 - sulfometil) (SMGL), ácido *N*- (2 - sulfoetil) - glutámico (SEGL), ácido *N*-metiliminodiacético (MIDA), ácido alfa - alanina -*N*, Ndiacético (alfa - ALDA), ácido serina -*N,N*-diacético (SEDA), ácido isoserina -*N*, Ndiacético (ISDA), ácido fenilalanina -*N*, Ndiacético (PHDA), ácido antranílico -*N*, Ndiacético (ANDA), ácido sulfanílico-*N*, Ndiacético (SLDA), ácido taurina -*N*, *N* diacético (TUDA) y ácido sulfometil -*N*, *N*-diacético (SMDA), *N*-(2-hidroxietil)-etilenediamina-*N,N'*, *N*(EDTA), dietanoglicina (DEG), ácido dietilentriaminopenta(metilenofosfónico), (DTPMP), ácido aminotris(metilenofosfónico) (ATMP), y combinaciones y sales de los mismos. Otros ejemplos de constructores y/o coconstructores se describen en, por ejemplo, WO 09/102854, EE. UU. 5977053

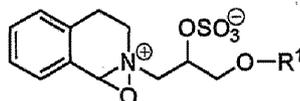
65 Sistemas blanqueadores

[0307] El detergente puede contener un 0-50 % en peso, como, por ejemplo, de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 25 %, de un sistema de blanqueo. Se puede utilizar cualquier sistema de blanqueo conocido en la técnica para usar en detergentes para la ropa. Los componentes adecuados del sistema de blanqueo incluyen catalizadores de blanqueo, fotoblanqueadores, activadores de blanqueo, fuentes de peróxido de hidrógeno tales como percarbonato de sodio y perboratos sódicos, perácidos preformados y mezclas de los mismos. Los perácidos preformados adecuados incluyen, pero no se limitan a, ácidos y sales peroxicarboxílicos, ácidos y sales percarbónicos, ácidos y sales perimidicos, ácidos y sales peroximonosulfúricos, por ejemplo, Oxone (R) y mezclas de los mismos. Ejemplos no limitantes de sistemas de blanqueo incluyen sistemas de blanqueo basados en peróxidos, que pueden comprender, por ejemplo, una sal inorgánica, incluyendo sales de metales alcalinos tales como sales de perborato de sodio (normalmente mono- o tetrahidrato), percarbonato, persulfato, perfosfato, sales de persulfato, en combinación con un activador de blanqueo formador de perácidos. El término activador de blanqueo se entiende en este documento como un compuesto que reacciona con blanqueador peroxigenado como peróxido de hidrógeno para formar un perácido. El perácido así formado constituye el blanqueador activado. Los activadores de blanqueo adecuados que se van a usar en este documento incluyen los que pertenecen a la clase de ésteres, amidas, imidas o anhídridos. Ejemplos adecuados son tetracetilendiamina (TAED), 4-[(3,5,5-trimetilhexanoil) oxil] bencenosulfonato sódico (ISONOBS), ácido diperoxi dodecanoico, 4-(dodecanoiloxi) bencenosulfonato (LOBS), 4-(decanoiloxi) bencenosulfonato, 4-(decanoiloxi) benzoato (DOBS), 4-(nonanoiloxi) - bencenosulfonato (NOBS) y/o los descritos en WO98/17767. Una familia particular de activadores de blanqueo de interés se describió en EP624154 y en esa familia se prefiere particularmente el acetil trietil citrato (ATC). El ATC o un triglicérido de cadena corta como la triacetina tiene la ventaja de que es respetuoso con el medio ambiente ya que termina degradándose en ácido cítrico y alcohol. Además, el acetil trietil citrato y la triacetina tienen una buena estabilidad hidrolítica en el producto durante el almacenamiento y son activadores de blanqueo eficientes. Por último, el ATC proporciona una buena capacidad de construcción al aditivo de lavandería. Alternativamente, el sistema de blanqueo puede comprender peroxiácidos, por ejemplo, del tipo amida, imida o sulfona. El sistema de blanqueo puede comprender también perácidos tales como el ácido 6-(ftalimido) peroxihexanoico (PAP). El sistema de blanqueo puede incluir también un catalizador de blanqueo. En algunas formas de realización, el componente de blanqueo puede ser un catalizador orgánico seleccionado del grupo que consiste en los catalizadores orgánicos que tienen las siguientes fórmulas:

(i)



(ii)



(iii) y mezclas de los mismos; en donde cada R¹ por separado es un grupo alquilo ramificado que contiene de 9 a 24 carbonos o un grupo alquilo lineal que contiene de 11 a 24 carbonos, preferiblemente cada R¹ por separado es un grupo alquilo ramificado que contiene de 9 a 18 carbonos o un grupo alquilo lineal que contiene de 11 a 18 carbonos, más preferiblemente cada R¹ se selecciona por separado del grupo que consiste en 2-propilheptilo, 2-butiloctilo, 2-pentilnonilo, 2-hexildecilo, n-dodecilo, n-tetradecilo, n-hexadecilo, n-octadecilo, iso-nonilo, iso-decil, tridecilo e iso-pentadecilo. Se describen otros ejemplos de sistemas de blanqueo, p. ej., en WO2007/087258, WO2007/087244, WO2007/087259 y WO2007/087242. Los fotoblanqueos adecuados pueden ser, por ejemplo, ftalocianina de zinc sulfonada

Polímeros

[0308] El detergente puede contener un 0-10 % en peso, como, por ejemplo, un 0,5-5 %, un 2-5 %, un 0,5-2 % o un 0,2-1 % de un polímero. Se puede utilizar cualquier polímero conocido en la técnica para usar en detergentes. El polímero puede funcionar como coconstructor tal como se ha mencionado anteriormente, o puede proporcionar antirredeposición, protección de fibras, liberación de suciedad, inhibición de transferencia de colorante, limpieza de grasa y/o propiedades antiespumantes. Algunos polímeros pueden tener más de una de las propiedades mencionadas anteriormente y/o más de uno de los motivos mencionados a continuación. Los ejemplos de polímeros incluyen (carboximetil) celulosa (CMC), alcohol (poli)vinílico (PVA), poli(vinilpirrolidona) (PVP), poli (etilenglicol) o óxido de (poli)etileno (PEG), poli(etilenimina) etoxilada, carboximetilululina (CMI), y policarboxilatos tales como PAA, PAA/PMA, ácido poliaspártico y copolímeros de lauril metacrilato/ácido acrílico, CMC modificado hidrofóticamente (HM-CMC) y siliconas, copolímeros de ácido tereftálico y glicoles oligoméricos, copolímeros de tereftalato de polietileno y tereftalato de polioxieteno (PET-POET), PVP, poli(vinilimidazol) (PVI), poli (vinilpiridín-N-óxido) (PVPO o PVPNO) y polivinilpirrolidona - vinilimidazol (PVPVI). Otros ejemplos de polímeros incluyen policarboxilatos sulfonados, óxido de polietileno y óxido de polipropileno (PEO-PPO) y diquaternium etoxisulfato. Otros ejemplos de polímeros se describen, por ejemplo, en WO 2006/130575. También se contemplan sales de los polímeros antes mencionados.

Agentes matizantes de tejidos

5 **[0309]** Las composiciones detergentes de la presente invención pueden incluir también agentes matizantes de tejidos tales como colorantes o pigmentos que, cuando se formulan en composiciones detergentes, pueden depositarse sobre un tejido cuando dicho tejido se pone en contacto con un líquido de lavado que comprende dichas composiciones detergentes y alterando así el tinte de dicho tejido a través de la absorción/reflejo de la luz visible. Los agentes blanqueadores fluorescentes emiten al menos algo de luz visible. Por el contrario, los agentes matizantes de tejidos alteran el tinte de una superficie cuando absorben al menos una porción del espectro de luz visible. Los agentes matizantes de tejidos adecuados incluyen colorantes y conjugados tinte-arcilla, y también pueden incluir pigmentos. Los colorantes adecuados incluyen tintes de molécula pequeña y tintes poliméricos. Los colorantes de molécula pequeña adecuados incluyen colorantes seleccionados del grupo que consiste en los colorantes que entran en las clasificaciones de índice de color (CI) de azul directo, rojo directo, violeta directo, azul ácido, rojo ácido, violeta ácido, azul básico, violeta básico y rojo básico o mezclas de los mismos, por ejemplo, como se describe en WO2005/03274, WO2005/03275, WO2005/03276 y EP1876226. La composición detergente comprende preferiblemente de aproximadamente un 0,00003 % en peso a aproximadamente un 0,2 % en peso, de aproximadamente un 0,00008 % en peso a aproximadamente un 0,05 % en peso, o incluso de aproximadamente un 0,0001 % en peso a aproximadamente un 0,04 % en peso de agente matizante de tejido. La composición puede comprender de un 0,0001 % en peso a un 0,2 % en peso de agente matizante de tejidos, esto puede preferirse especialmente cuando la composición está en forma de una bolsa de dosis unitaria. Los agentes matizantes adecuados también se describen, p. ej., en WO 2007/087257 y WO2007/087243.

Enzimas Adicionales

25 **[0310]** El aditivo de detergente, así como la composición detergente pueden comprender una o más enzimas adicionales tales como una proteasa, una lipasa, una cutinasa, una amilasa, una carbohidrasa, una celulasa, una pectinasa, una mananasa, una arabinasa, una galactanasa, una xilanasas, una oxidasa, p. ej., una lacasa y/o peroxidasa.

30 **[0311]** En general, las propiedades de la enzima o enzimas seleccionadas deben ser compatibles con el detergente seleccionado, (es decir, pH óptimo, compatibilidad con otros ingredientes enzimáticos y no enzimáticos, etc.), y la(s) enzima(s) debe(n) estar presentes en cantidades efectivas.

35 **[0312]** Celulasas: Las celulasas adecuadas incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen mutantes modificados químicamente o diseñados con proteínas. Las celulasas adecuadas incluyen celulasas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, por ejemplo, las celulasas fúngicas producidas a partir de *Humicola insolens*, *Myceliophthora thermophila* y *Fusarium oxysporum* revelado en EE. UU. 4.435.307, EE. UU. 5.648.263, EE. UU. 5.691.178, EE. UU. 5.776.757 y WO 89/09259.

40 **[0313]** Especialmente adecuadas son las celulasas alcalinas o neutras que tienen beneficios de cuidado del color. Ejemplos de tales celulasas son las celulasas descritas en EP 0 495 257, EP 0 531 372, WO 96/11262, WO 96/29397, WO 98/08940. Otros ejemplos son variantes de celulasa tales como las descritas en WO 94/07998, EP 0 531 315, EE. UU. 5.457.046, EE. UU. 5.686.593, EE. UU. 5.763.254, WO 95/24471, WO 98/12307 y PCT/DK98/00299.

[0314] Ejemplo de celulasas que exhiben actividad de endo-beta-1,4-glucanasa (EC 3.2.1.4) son aquellas que se han descrito en WO02/099091.

50 **[0315]** Otros ejemplos de celulasas incluyen la familia de 45 celulasas descritas en WO96/29397, y especialmente sus variantes que tienen sustituciones, inserciones y/o deleciones en una o más de las posiciones correspondientes a las siguientes posiciones en SEQ ID NO: 8 de WO 02/099091: 2, 4, 7, 8, 10, 13, 15, 19, 20, 21, 25, 26, 29, 32, 33, 34, 35, 37, 40, 42, 42a, 43, 44, 48, 53, 54, 55, 58, 59, 63, 64, 65, 66, 67, 70, 72, 76, 79, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 91, 93, 95, 95d, 95h, 95j, 97, 100, 101, 102, 103, 113, 114, 117, 119, 121, 133, 136, 137, 138, 139, 140a, 141, 143a, 145, 146, 147, 150e, 150j, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160c, 160e, 160k, 161, 162, 164, 165, 168, 170, 171, 172, 173, 175, 176, 178, 181, 183, 184, 185, 186, 188, 191, 192, 195, 196, 200 y/o 20, preferiblemente seleccionados entre P19A, G20K, Q44K, N48E, Q119H o Q146R.

60 **[0316]** Las celulasas disponibles comercialmente incluyen Celluzyme™, Carezyme™ (Novozymes A/S), Clazinase® y Puradax HA™ (Genencor International Inc.) y KAC-500(B)™ (Kao Corporation).

65 **[0317]** Proteasas: La enzima adicional puede ser otra proteasa o variante de proteasa. La proteasa puede ser de origen animal, vegetal o microbiano, incluyendo mutantes modificados químicamente o genéticamente. Se prefiere el origen microbiano. Puede ser una proteasa alcalina, tal como una serina proteasa o una metaloproteasa. Una serina proteasa puede ser, por ejemplo, de la familia S1, como la tripsina, o la familia

S8, la como subtilisina. Una metaloproteasa puede ser, por ejemplo, una termolisina de, p. ej., las familias M4, M5, M7 o M8.

5 **[0318]** El término "subtilasas" se refiere a un subgrupo de serina proteasa según Siezen et al., Protein Engng. 4 (1991) 719-737 y Siezen et al. Protein Science 6 (1997) 501 - 523. Las serina proteasas son un subgrupo de proteasas que se caracterizan por tener una serina en el sitio activo, que forma un aducto covalente con el sustrato. Las subtilasas se pueden repartir en 6 subdivisiones, es decir, la familia de la subtilisina, la familia de la termitasa, la familia de la proteinasa K, la familia de la peptidasa lantibiótica, la familia de la kexina y la familia de la pirrolisina. En un aspecto de la invención, la proteasa puede ser una subtilasa, tal como una
10 subtilisina o una variante de la misma. Además, las subtilasas (y las serina proteasas) se caracterizan por tener dos residuos de aminoácidos en el sitio activo aparte de la serina, a saber, una histidina y un residuo de ácido aspártico.

15 **[0319]** Ejemplos de subtilisinas son las derivadas de *Bacillus* tales como subtilisina lentus, *Bacillus lentus*, subtilisina Novo, subtilisina Carlsberg, *Bacillus licheniformis*, subtilisina BPN', subtilisina 309, subtilisina 147 y subtilisina 168 descritas en WO 89/06279 y la proteasa PD138 (WO 93/18140). Ejemplos adicionales de serina proteasas se describen en WO 98/020115, WO 01/44452, WO 01/58275, WO 01/58276, WO 03/006602 y WO 04/099401. Un ejemplo de una variante de subtilasa puede ser aquel que tiene mutaciones en cualquiera de las posiciones: 3, 4, 9, 15, 27, 36, 68, 76, 87, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 106, 118, 120, 123, 128, 129, 130, 160, 167, 170, 194, 195, 199, 205, 217, 218, 222, 232, 235, 236, 245, 248, 252 y 274 utilizando la numeración BPN. Más preferiblemente, las variantes de subtilasa pueden comprender las mutaciones: S3T, V4I, S9R, A15T, K27R, * 36D, V68A, N76D, N87S, R, * 97E, A98S, S99G, D, A, S99AD, S101G, M, R S103A, V104I, Y, N, S106A, G118V, R, H120D, N, N123S, S128L, P129Q, S130A, G160D, Y167A, R170S, A194P, G195E, V199M, V205I, L217D, N218D, M222S, A232V, K235L, Q236H, Q245R, N252K, T274A (utilizando numeración BPN '). Otra proteasa preferida es la proteasa alcalina de *Bacillus lentus* DSM 5483, como se describe por ejemplo en WO 95/23221, y sus variantes que se describen en WO 92/21760, WO 95/23221, EP 1921147 y EP 1921148.

30 **[0320]** Ejemplos de proteasas de tipo tripsina son la tripsina (por ejemplo, de origen porcino o bovino) y la proteasa *Fusarium* descrita en WO 89/06270 y WO 94/25583. Ejemplos de proteasas útiles son las variantes descritas en WO 92/19729, WO 98/20115, WO 98/20116 y WO 98/34946, especialmente las variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 27, 36, 57, 76, 87, 97, 101, 104, 120, 123, 167, 170, 194, 206, 218, 222, 224, 235 y 274.

35 **[0321]** Ejemplos de metaloproteasas son la metaloproteasa neutra según se describe en WO 07/044993.

40 **[0322]** Las enzimas de proteasa disponibles comercialmente preferidas incluyen Alcalasa[™] Coronasa[™], Duralase[™], Durazym[™], Esperase[™], Everlase[™], Kanasa[™], Liquanase[™], Liquanase Ultra[™], Ovozyme[™], Polarzyme[™], Primase[™] Release[™], Savinase[™] y Savinase Ultra[™], (Novozymes A/S), Axapem[™] (Gist-Brocades N.V.), BLAP y BLAP X (Henkel AG & Co. KGaA), Excellase[™], FN2[™], FN3[™], FN4[™], Maxaca[™], Maxapem[™], Maxatase[™], Properase[™], Purafast[™], Purafect[™], Purafect OxP[™], Purafect Prime[™] y Puramax[™] (Genencor int.).

45 **[0323]** Lipasas y cutinasas: Las lipasas y cutinasas adecuadas incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen enzimas mutantes modificadas químicamente o modificadas con proteínas. Los ejemplos incluyen la lipasa de *Thermomyces*, p. ej. de *T. lanuginosus* (anteriormente llamado *Humicola lanuginosa*) tal como se describe en EP258068 y EP305216, cutinasa de *Humicola*, p. ej. *H. insolens* (WO96/13580), lipasa de cepas de *Pseudomonas* (algunas de estos ahora se llaman *Burkholderia*), p. ej. *P. alcaligenes* o *P. pseudoalcaligenes* (EP218272), *P. cepacia* (EP331376), *P. sp. cepa* SD705 (WO95/06720 y WO96/27002), *P. wisconsinensis* (WO96/12012), lipasas tipo GDSL de *Streptomyces* (WO10/065455), cutinasa de *Magnaporthe grisea* (WO10/107560), cutinasa de *Pseudomonas mendocina* (EE.UU. 5.389.536), lipasa de *Thermobifida fusca* (WO11/084412), *Geobacillus stearothermophilus* (WO11/084417) lipasa de *Bacillus subtilis* (WO11/084599) y lipasa de *Streptomyces griseus* (WO11/150157) y *S. pristinaespiralis* (WO12/137147).

55 **[0324]** Otros ejemplos son las lipasas a veces denominadas aciltransferasas o perhidrolasas, p. ej., aciltransferasas con homología con la lipasa A de *Candida antarctica* (WO10/111143), aciltransferasa de *Mycobacterium smegmatis* (WO05/56782), perhidrolasas de la familia CE 7 (WO09/67279), y variantes de la perhidrolasa de *M. smegmatis* en particular la variante S54V utilizada en el producto comercial Gentle Power Bleach de Huntsman Textile Effects Pte Ltd (WO10/100028).

60 **[0325]** Otros ejemplos son variantes de lipasa tales como los descritos en EP407225, WO92/05249, WO94/01541, WO94/25578, WO95/14783, WO95/30744, WO95/35381, WO95/22615, WO96/00292, WO97/04079, WO97/07202, WO00/34450, WO00/60063, WO01/92502, WO07/87508 y WO09/109500.

65 **[0326]** Los productos de lipasa comercial preferidos incluyen Lipolasa[™], Lipex[™], Lipolex[™] y Lipoclean[™] (Novozymes A/S), Lumafast (originalmente de Genencor) y Lipomax (originalmente de Gist-Brocades).

[0327] Amilasas: La amilasa puede ser una alfa-amilasa, una beta-amilasa o una glucoamilasa y puede ser de origen bacteriano u fúngico. Se incluyen mutantes modificados químicamente o diseñados con proteínas. Las amilasas incluyen, por ejemplo, alfa-amilasas obtenidas a partir de *Bacillus*, por ejemplo, una cepa especial de *Bacillus licheniformis*, descrita con más detalle en GB 1.296.839.

[0328] Ejemplos de amilasas son aquellos que tienen SEQ ID NO: 3 en WO 95/10603 o variantes que tienen una identidad de secuencia del 90 % con SEQ ID NO: 3 de la misma. Las variantes preferidas se describen en WO 94/02597, WO 94/18314, WO 97/43424 y SEQ ID NO: 4 de WO 99/019467, tales como variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 15, 23, 105, 106, 124, 128, 133, 154, 156, 178, 179, 181, 188, 190, 197, 201, 202, 207, 208, 209, 211, 243, 264, 304, 305, 391, 408 y 444 de SEQ ID NO: 3 en WO 95/10603.

[0329] Otras amilasas que se pueden usar son amilasas que tienen SEQ ID NO: 6 en WO 02/010355 o variantes de las mismas, así como la alfa-amilasa híbrida que comprende los residuos 1-33 de la alfa-amilasa derivada de *B. amyloliquefaciens* mostrada en SEQ ID NO: 6 de WO 2006/066594 y los residuos 36-483 de la alfa-amilasa de *B. licheniformis* mostrada en SEQ ID NO: 4 de WO 2006/066594.

[0330] Otros ejemplos de amilasa son las amilasas que tienen SEQ ID NO: 6 en WO 99/019467 o variantes de las mismas y las amilasas que tienen SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 7 de WO 96/023873 o sus variantes. Otras amilasas que se pueden usar son las amilasas que tienen SEQ ID NO: 2 de WO 08/153815, SEQ ID NO: 10 en WO 01/66712 o sus variantes.

[0331] Las amilasas adicionales que se pueden usar son amilasas que tienen la SEQ ID NO: 2 de WO 09/061380 o variantes de las mismas y las alfa-amilasas que tienen SEQ ID NO: 12 en WO01/66712 o una variante de las mismas.

[0332] Las amilasas disponibles comercialmente son Duramyl™, Termamyl™, Fungamyl™, Stainzyme™, Stainzyme Plus™, Natalase™ y BAN™ (Novozymes A/S), Rapidasa™ y Purastar™ (de Genencor International Inc.).

[0333] Peroxidasas/oxidadas: Las peroxidasas/oxidadas adecuadas incluyen aquellas de origen vegetal, bacteriano o fúngico. Se incluyen mutantes modificados químicamente o diseñados con proteínas. Ejemplos de peroxidasas útiles incluyen peroxidasas de *Coprinus*, por ejemplo, de *C. cinereus*, y variantes de las mismas como las descritas en WO 93/24618, WO 95/10602 y WO 98/15257.

[0334] Las peroxidasas disponibles comercialmente incluyen Guardzyme™ (Novozymes A/S).

[0335] Las enzimas o enzimas detergentes pueden incluirse en una composición 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, pueden formularse, por ejemplo, como un granulado, un líquido, una pasta, etc. Las formulaciones de aditivos de detergentes preferidas son granulados, en particular granulados no pulverulentos, líquidos, en particular líquidos estabilizados, o pastas.

[0336] Los granulados no pulverulentos se pueden producir, p. ej., como se describe en EE. UU. 4.106.991 y 4.661.452 y opcionalmente pueden revestirse por métodos conocidos en la técnica. Ejemplos de materiales de revestimiento cerosos son productos de poli(oxietileno) (polietilenglicol, PEG) con pesos molares medios de 1000 a 20 000; nonilfenoles etoxilados que tienen de 16 a 50 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos etoxilados en los que el alcohol contiene de 12 a 20 átomos de carbono y en el que hay de 15 a 80 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos; ácidos grasos; y mono-, di- y triglicéridos de ácidos grasos. Ejemplos de materiales de revestimiento que forman películas adecuados para aplicación mediante técnicas de lecho fluidificado se dan en GB 1483591. Los preparados enzimáticos líquidos pueden, por ejemplo, estabilizarse añadiendo un poliol tal como propilenglicol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico o ácido bórico según métodos establecidos. Las enzimas protegidas pueden prepararse de acuerdo con el método descrito en EP 238,216.

Materiales adjuntos

[0337] También pueden utilizarse cualesquiera componentes detergentes conocidos en la técnica para uso en detergentes para la ropa. Otros componentes detergentes opcionales incluyen agentes anticorrosión, agentes antiencogimiento, agentes contra la deposición de suciedad, agentes antiarrugas, bactericidas, aglutinantes, inhibidores de corrosión, agentes desintegrantes/disgregantes, colorantes, estabilizadores enzimáticos (incluyendo ácido bórico, boratos, CMC, y/o polioles tales como propilenglicol), acondicionadores de tejidos incluyendo arcillas, rellenos/auxiliares de procesamiento, agentes blanqueadores/blanqueantes ópticos, reforzadores de espuma, reguladores de espuma, perfumes, agentes

de suspensión de suciedad, suavizantes, supresores de espuma, inhibidores de deslustrado y agentes de absorción de humedad, ya sea solos o en combinación. Se puede utilizar cualquier ingrediente conocido en la técnica para usar en detergentes para la ropa. La elección de tales ingredientes está dentro de la técnica del artesano.

5
 [0338] Dispersantes: Las composiciones detergentes de la presente invención también pueden contener dispersantes. En particular, los detergentes en polvo pueden comprender dispersantes. Los materiales orgánicos solubles en agua adecuados incluyen los ácidos homo- o copoliméricos o sus sales, en los que el ácido policarboxílico comprende al menos dos radicales carboxilo separados entre sí por no más de dos átomos de carbono. Los dispersantes adecuados se describen por ejemplo en Powdered Detergents, Surfactant science series volumen 71, Marcel Dekker, Inc.

15
 [0339] Agentes inhibidores de la transferencia de colorantes: Las composiciones detergentes de la presente invención también pueden incluir uno o más agentes inhibidores de la transferencia de colorantes. Los agentes poliméricos adecuados inhibidores de la transferencia de colorantes incluyen, pero no se limitan a, polímeros de polivinilpirrolidona, polímeros de N-óxido de poliamina, copolímeros de N-vinilpirrolidona y N-vinilimidazol, poliviniloxazolidonas y polivinilimidazoles o mezclas de los mismos. Cuando están presentes en una composición, los agentes inhibidores de la transferencia de colorantes pueden estar presentes en niveles de aproximadamente un 0,0001 % a aproximadamente un 10 %, de aproximadamente un 0,01 % a aproximadamente un 5 % o incluso de aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 3 % en peso de la composición.

25
 [0340] Agentes blanqueadores fluorescentes: Las composiciones detergentes de la presente invención contendrán preferiblemente también componentes adicionales que pueden teñir los artículos que están limpiando, tales como agentes blanqueadores fluorescentes o blanqueantes ópticos. Cuando está presente, el blanqueador está preferiblemente en un nivel de aproximadamente un 0,01 % a aproximadamente un 0,5 %. Cualquier agente blanqueador fluorescente adecuado para usar en una composición detergente para la colada puede usarse en la composición de la presente invención. Los agentes blanqueadores fluorescentes más comúnmente usados son los que pertenecen a las clases de derivados de ácido diamino estilbena sulfónico, derivados de diarilpirazolona y derivados de bisfenil-distirilo. Ejemplos del tipo derivado del ácido diamino estilbena sulfónico de agentes blanqueadores fluorescentes incluyen las sales de sodio de: 4,4'-bis-(2-dietanolamino-4-anilino-s-triazin-6-ilamino) estilbena-2,2'-disulfonato; 4,4'-bis-(2,4-dianilino-s-triazin-6-ilamino) estilbena-2,2'-disulfonato; 4,4'-bis-(2-anilino-4(N-metil-N-2-hidroxietilamino)-s-triazin-6-ilamino) estilbena-2,2'-disulfonato; 4,4'-bis-(4-fenil-2,1,3-triazol-2-il) estilbena-2,2'-disulfonato; 4,4'-bis-2-(2-anilino-4 (1-metil-2-hidroxietilamino)-s-triazin-6-ilamino) estilbena-2,2'-disulfonato y 2- (estilbil-4" nafto-1',2', 4,5)-1,2,3-triazol-2"-sulfonato. Los agentes blanqueantes fluorescentes preferidos son Tinopal DMS y Tinopal CBS disponible en Ciba-Geigy AG, Basilea, Suiza. Tinopal DMS es la sal disódica del 4,4'-bis- (2-morfolino-4-anilino-s-triazin-6-ilamino) estilbena disulfonato. Tinopal CBS es la sal disódica del 2,2'-bis- (fenil-estiril) disulfonato. También se prefieren los agentes blanqueadores fluorescentes como el Parawhite KX disponible comercialmente, proporcionado por Paramount Minerals and Chemicals, Mumbai, India. Otros fluorescentes adecuados para su uso en la invención incluyen las 1 - 3 - diaril - pirazolininas y las 7 - alquilaminocumarinas. Los niveles adecuados de blanqueador fluorescente incluyen desde niveles por debajo de aproximadamente un 0,01, de un 0,05, de aproximadamente un 0,1 o incluso de aproximadamente un 0,2% en peso hasta niveles por encima de un 0,5 o incluso de un 0,75 % en peso.

45
 [0341] Polímeros anti manchas: Las composiciones detergentes de la presente invención pueden incluir también uno o más polímeros anti manchas que ayudan a la eliminación de suciedad de tejidos tales como los tejidos con base de algodón y poliéster, en particular la eliminación de suciedad hidrófoba de telas con base de poliéster. Los polímeros anti manchas pueden ser, por ejemplo, polímeros no iónicos o aniónicos basados en tereftalato, polivinil caprolactama y copolímeros relacionados, copolímeros de vinilo para injertos, poliamidas de poliéster, véase por ejemplo el capítulo 7 de Powdered Detergents, Surfactant science series volumen 71, Marcel Dekker, Inc. Otro tipo de polímeros anti manchas son los polímeros alcoxilados anfífilicos para limpiar la grasa que comprenden una estructura principal y una multitud de grupos alcoxilados unidos a esa estructura principal. La estructura principal puede comprender una estructura de polialquilenimina o una estructura de polialcanolamina como se describe en detalle en WO 2009/087523. Además, los copolímeros de injerto aleatorios son polímeros anti manchas adecuados. Los copolímeros de injerto adecuados se describen con más detalle en WO 2007/138054, WO 2006/108856 y WO 2006/113314. Otros polímeros antimanchas son estructuras de polisacáridos sustituidos, especialmente estructuras celulósicas sustituidas tales como derivados modificados de celulosa como los descritos en EP 1867808 o WO 2003/040279. Los polímeros celulósicos adecuados incluyen celulosa, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, amidas de celulosa y mezclas de los mismos. Los polímeros celulósicos adecuados incluyen celulosa modificada aniómicamente, celulosa modificada no ionicamente, celulosa modificada catiónicamente, celulosa modificada zwitteriónicamente y mezclas de los mismos. Los polímeros celulósicos adecuados incluyen metilcelulosa, carboximetilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxilpropilmetilcelulosa, éster de carboximetilcelulosa y mezclas de los mismos.

[0342] Agentes antirredeposición: Las composiciones detergentes de la presente invención también pueden incluir uno o más agentes antirredeposición tales como carboximetilcelulosa (CMC), alcohol polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona (PVP), polioxietileno y/o polietilenglicol (PEG), homopolímeros de ácido acrílico, copolímeros de ácido acrílico y maleico, y polietiliminas etoxiladas. Los polímeros con base de celulosa descritos anteriormente en los polímeros antimanchas pueden también funcionar como agentes antirredeposición.

[0343] Otros materiales adyuvantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, agentes anti-encogimiento, agentes antiarrugas, bactericidas, aglutinantes, portadores, colorantes, estabilizadores enzimáticos, suavizantes de tejidos, rellenos, reguladores de espuma, hidrótopos, perfumes, pigmentos, supresores de espuma, disolventes y estructurantes para detergentes líquidos y/o agentes de flexibilización de estructuras.

Formulación de productos detergentes

[0344] La composición detergente de la invención puede estar en cualquier forma conveniente, por ejemplo, una barra, una pastilla homogénea, una pastilla que tiene dos o más capas, una bolsa que tiene uno o más compartimentos, un polvo normal o compacto, un gránulo, una pasta, un gel, o un líquido normal, compacto o concentrado. Existen varias formas de formulación de detergentes tales como capas (fases iguales o diferentes), bolsas, así como formas para la unidad de dosificación a máquina.

[0345] Las bolsas pueden ser configuradas como mono o multicompartimento. Puede ser de cualquier forma, forma y material que sea adecuado para sujetar la composición, p. ej., sin permitir la liberación de la composición de la bolsa antes del contacto con el agua. La bolsa está hecha de una película soluble en agua que encierra un volumen interior. Dicho volumen interior se puede dividir en compartimentos de la bolsa. Las películas preferidas son materiales poliméricos preferiblemente polímeros que se forman como película o lámina. Los polímeros, copolímeros o derivados preferidos de los mismos son poliácridatos seleccionados, copolímeros de acrilato solubles en agua, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, dextrina sódica, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, maltodextrina, poliácridatos, más preferiblemente copolímeros de alcohol polivinílico e hidroxipropil metil celulosa (HPMC). Preferiblemente, el nivel de polímero en la película, por ejemplo, PVA, es al menos de un 60 % aproximadamente. El peso molecular medio preferido será típicamente de aproximadamente 20.000 a aproximadamente 150.000. Las películas también pueden ser composiciones de mezcla que comprenden mezclas de polímeros hidrolíticamente degradables y solubles en agua tales como poliactida y alcohol polivinílico (conocidas bajo la referencia comercial M8630 tal como la vende Chris Craft In. Prod. De Gary, Indiana, EE. UU.) más plastificantes como glicerol, etilenglicerol, propilenglicol, sorbitol y mezclas de los mismos. Las bolsas pueden comprender una composición sólida o componentes parciales para la limpieza de ropa y/o una composición líquida o componentes parciales para la limpieza separados por la película soluble en agua. El compartimento para componentes líquidos puede tener una composición diferente a los compartimentos que contienen sólidos. Ref: (US2009/0011970 A1).

[0346] Los ingredientes detergentes pueden estar separados físicamente entre sí por compartimentos en bolsas solubles en agua o en diferentes capas de comprimidos. Por lo tanto, la interacción negativa de almacenamiento entre los componentes puede evitarse. Diferentes perfiles de disolución de cada uno de los compartimentos también pueden dar lugar a disolución retardada de los componentes seleccionados en la solución de lavado.

[0347] Un detergente líquido o en gel, que no está en dosis unitarias, puede ser acuoso, conteniendo típicamente al menos un 20 % en peso y hasta un 95 % de agua, como, por ejemplo, hasta aproximadamente un 70 % de agua, hasta aproximadamente un 65 % de agua, hasta aproximadamente un 55 % de agua, hasta aproximadamente un 45 % de agua, hasta aproximadamente un 35 % de agua. Otros tipos de líquidos, incluyendo sin limitación, alcanoles, aminas, dioles, éteres y polioles pueden incluirse en un líquido o gel acuosos. Un detergente acuoso líquido o en gel puede contener 0-30 % de disolvente orgánico. Un detergente líquido o en gel puede ser no acuoso.

Pastillas de jabón de lavandería

[0348] Las enzimas de la invención pueden añadirse a pastillas de jabón de lavandería y usarse para lavado de ropa, tejidos y/o textiles. El término pastilla de jabón de lavandería incluye pastillas de lavandería, pastillas de jabón, pastillas combinadas, pastillas de syndet y pastillas de detergente. Los tipos de pastillas generalmente difieren en el tipo de surfactante que contienen, y el término pastilla de jabón de lavandería incluye aquellos que contienen jabones de ácidos grasos y/o jabones sintéticos. La pastilla de jabón de lavandería tiene una forma física que es sólida y no líquida, gel o polvo a temperatura ambiente. El término sólido se define como una forma física que no cambia significativamente con el tiempo, es decir, si un objeto sólido (por ejemplo, una pastilla de jabón de lavandería) se coloca dentro de un recipiente, el objeto sólido no cambia de forma para llenar el recipiente en el que se coloca. La pastilla es un sólido típicamente en forma de barra, pero puede estar en otras formas sólidas, tales como redondas u ovaladas.

5 **[0349]** La pastilla de jabón de lavandería puede contener una o más enzimas adicionales, inhibidores de proteasa tales como aldehídos peptídicos (o aducto de hidrosulfito o aducto hemiacetalico), ácido bórico, borato, borax y/o derivados de ácido fenilborónico tales como ácido 4-formilfenilborónico, uno o más jabones o surfactantes sintéticos, polioles tales como glicerina, compuestos que controlan el pH tales como ácidos grasos, ácido cítrico, ácido acético y/o ácido fórmico y/o una sal de un catión monovalente y un anión orgánico en el que el catión monovalente puede ser, por ejemplo, Na^+K^+ o NH_4^+ y el anión orgánico puede ser, por ejemplo, formiato, acetato, citrato o lactato, de manera que la sal de un catión monovalente y un anión orgánico puede ser, por ejemplo, formato de sodio.

10 **[0350]** La pastilla de jabón de lavandería también puede contener agentes complejantes como EDTA y HEDP, perfumes y/o diferentes tipos de rellenos, surfactantes, p. ej., agentes surfactantes poliméricos, surfactantes sintéticos aniónicos, agentes supresores de suciedad poliméricos, agentes quelantes de detergentes, agentes estabilizantes, rellenos, tintes, colorantes, inhibidores de transferencia de colorantes, policarbonatos alcoxilados, supresores de espuma, estructurantes, aglutinantes, agentes de lixiviación, activadores de blanqueo, agentes para eliminación de suciedad arcillosa, agentes antirredeposición, agentes dispersantes poliméricos, blanqueadores, suavizantes de tejidos, perfumes y/u otros compuestos conocidos en la técnica.

20 **[0351]** La pastilla de jabón de lavandería se puede procesar en equipos convencionales de fabricación de pastillas de jabón de lavandería, tales como: mezcladores, compresoras, por ejemplo, una compresora de vacío de dos etapas, extrusores, cortadores, estampadores de logotipo, túneles de enfriamiento y envoltorios, entre otros. La invención no está limitada a la preparación de las pastillas de jabón de lavandería mediante un único método. La premezcla de la invención se puede añadir al jabón en diferentes etapas del procedimiento. Por ejemplo, se puede preparar la premezcla que contiene un jabón, una enzima, opcionalmente una o más enzimas adicionales, un inhibidor de proteasa y una sal de un catión monovalente y un anión orgánico, y la mezcla se somete a continuación a una compresora. La enzima y las enzimas opcionales adicionales pueden añadirse al mismo tiempo que el inhibidor de proteasa, por ejemplo, en forma líquida. Además de la etapa de mezclado y la etapa de compresión, el proceso puede comprender además las etapas de fresado, extrusión, corte, estampado, enfriamiento y/o envoltura.

30 Formulaciones de detergentes granulares

35 **[0352]** Un detergente granular puede formularse como se describe en WO09/092699, EP1705241, EP1382668, WO07/001262, US6472364, WO04/074419 o WO09/102854. Otras formulaciones de detergentes útiles se describen en WO09/124162, WO09/124163, WO09/117340, WO09/117341, WO09/117342, WO09/072069, WO09/063355, WO09/132870, WO09/121757, WO09/112296, WO09/112298, WO09/103822, WO09/087033, WO09/050026, WO09/047125, WO09/047126, WO09/047127, WO09/047128, WO09/021784, WO09/010375, WO09/000605, WO09/122125, WO09/095645, WO09/040544, WO09/040545, WO09/024780, WO09/004295, WO09/004294, WO09/121725, WO09/115391, WO09/115392, WO09/074398, WO09/074403, WO09/068501, WO09/065770, WO09/021813, WO09/030632 y WO09/015951.

45 **[0353]** WO2011025615, WO2011016958, WO2011005803, WO2011005623, WO2011005730, WO2011005844, WO2011005904, WO2011005630, WO2011005830, WO2011005912, WO2011005905, WO2011005910, WO2011005813, WO2010135238, WO2010120863, WO2010108002, WO2010111365, WO2010108000, WO2010107635, WO2010090915, WO2010033976, WO2010033746, WO2010033747, WO2010033897, WO2010033979, WO2010030540, WO2010030541, WO2010030539, WO2010024467, WO2010024469, WO2010024470, WO2010025161, WO2010014395, WO2010044905,

50 **[0354]** WO2010145887, WO2010142503, WO2010122051, WO2010102861, WO2010099997, WO2010084039, WO2010076292, WO2010069742, WO2010069718, WO2010069957, WO2010057784, WO2010054986, WO2010018043, WO2010003783, WO2010003792,

55 **[0355]** WO2011023716, WO2010142539, WO2010118959, WO2010115813, WO2010105942, WO2010105961, WO2010105962, WO2010094356, WO2010084203, WO2010078979, WO2010072456, WO2010069905, WO2010076165, WO2010072603, WO2010066486, WO2010066631, WO2010066632, WO2010063689, WO2010060821, WO2010049187, WO2010031607, WO2010000636,

60 **[0356]** La presente invención se describe además mediante los siguientes ejemplos que no deben ser interpretados como limitantes del alcance de la invención.

EJEMPLOS

Materiales y métodos

65 **Ensayos de proteasa**

1) Ensayo Suc-AAPF-pNA:**[0357]**

pNA: Suc-AAPF-pNA (Bachem L-1400).

5 Temperatura: Temperatura ambiente (25 ° C)

Tampones de ensayo: ácido succínico 100 mM, HEPES 100 mM, CHES 100 mM, CABS 100 mM, CaCl₂ 1 mM, KCl 150 mM, Triton X - 100 al 0,01 % 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.

10 **[0358]** Se mezclaron 20 µl de proteasa (diluida en Triton X - 100 al 0,01 %) con 100 µl de tampón de ensayo. El ensayo se inició añadiendo 100 µl de sustrato de pNA (50 mg disueltos en 1,0 ml de DMSO y posteriormente diluido 45 veces con Triton X - 100 al 0,01 %). El aumento de OD₄₀₅ se monitorizó como una medida de la actividad proteasa.

2) Ensayo de Protazyme AK:**[0359]**

Sustrato: comprimido de Protazyme AK (caseína reticulada y teñida; de Megazyme)

Temperatura: controlada (temperatura de ensayo).

20 Tampón de ensayo: ácido succínico 100 mM, HEPES 100 mM, CHES 100 mM, CABS 100 mM, CaCl₂ 1 mM, KCl 150 mM, Triton X - 100 al 0,01 %, pH 6,5 o pH 7,0.

25 **[0360]** Se suspendió un comprimido de Protazyme AK en 2,0 ml de Triton X-100 al 0,01 % mediante agitación suave. Se dispensaron 500 µl de esta suspensión y 500 µl de tampón de ensayo en un tubo Eppendorf y se colocaron sobre hielo. Se añadieron 20 µl de muestra de proteasa (diluida en Triton X - 100 al 0,01 %). El ensayo se inició transfiriendo el tubo Eppendorf a un Eppendorf thermomixer, que se configuró a la temperatura del ensayo. El tubo se incubó durante 15 minutos en el Eppendorf thermomixer a su máxima velocidad de agitación (1400 rpm). La incubación se detuvo transfiriendo el tubo de nuevo al baño de hielo. A 30 continuación, el tubo se centrifugó en una centrifugadora enfriada en hielo durante unos minutos y se transfirieron 200 µl de sobrenadante a una placa de microtitulación. OD₆₅₀ se leyó como una medida de la actividad de la proteasa. Se incluyó un tampón amortiguador en el ensayo (en lugar de una enzima).

3) Ensayo Suc - AAPX - pNA:

35

[0361]

sustratos de 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) 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)

40

Temperatura: Temperatura ambiente (25 ° C)

Tampón de ensayo: ácido succínico 100 mM, HEPES 100 mM, CHES 100 mM, CABS 100 mM, CaCl₂ 1 mM, KCl 150 mM, Triton X - 100 al 0,01 %, pH 9,0.

45 **[0362]** Se mezclaron 20 µl de proteasa (diluida en Triton X - 100 al 0,01 %) con 100 µl de tampón de ensayo. El ensayo se inició añadiendo 100 µl de sustrato de pNA (50 mg disueltos en 1,0 ml de DMSO y posteriormente diluido 45x con Triton X - 100 al 0,01 %). El aumento de OD₄₀₅ se monitorizó como una medida de la actividad proteasa.

Ensayo de o-ftaldialdehído (OPA)

50

[0363] Este ensayo detecta aminas primarias y por tanto la escisión de enlaces peptídicos mediante una proteasa puede medirse como la diferencia de absorbancia entre una muestra tratada con proteasa y una muestra de control. El ensayo se realiza esencialmente de acuerdo con Nielsen *et al.* (Nielsen, PM, Petersen, D, Dampmann, C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis, 2001, J Food Sci, 66: 642-646).

55

[0364] Se filtran 500 µl de muestra a través de un filtro de centrifugado Microcon de 100 kDa (60 min, 11.000 rpm, 5 ° C). Las muestras se diluyen apropiadamente (por ejemplo, 10, 50 o 100 veces) en agua desionizada y se cargan 25 µl de cada muestra en una placa de microtitulación de 96 pocillos (5 replicados). Se dispensan 200 µl de reactivo OPA (tetaborato de sodio decahidratado 100 mM, dodecilsulfato sódico (SDS) 3,5 mM, di-tiotreitol (DDT) 5,7 mM, o-ftaldialdehído 6 mM) en todos los pocillos, la placa se agita (10 s, 750 rpm) y la absorbancia se mide a 340 nm.

60

Ensayo de harina de soja y maíz (ensayo SMM)

65

[0365] Se utilizó un ensayo de punto final utilizando harina de soja y maíz como sustrato para obtener el perfil de actividad de las proteasas a pH 3-7.

Sustrato: harina de soja y maíz mezclada en una proporción de 30:70.

Tampones de ensayo: Se prepararon 9 tampones que contenían ácido succínico 100 mM, HEPES 100 mM, CHES 100 mM, CAPS 100 mM, CaCl₂ 1 mM, KCl 150 mM, Triton X-100 0,01 % y se ajustaron usando HCl o NaOH a un valor de pH tal que después de que un sustrato se harina de soja y maíz (1 g) se hubiera mezclado con tampón de ensayo (10 ml) para dar una suspensión, el pH final de la suspensión fue uno de los siguientes valores de pH: 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0 y 11,0.

[0366] La pasta de sustrato (2 ml) se mezcló durante 30 minutos antes de la adición de proteasa y se incubó durante 3 horas a 40°C (500 rpm). Se disolvió proteasa (200 mg de proteína enzimática/kg de materia seca) en 100 µl de tampón 100 mM de acetato de sodio (NaOAc) (9,565 g/l de NaOAc, 1,75 g/l de ácido acético, CaCl₂ 5 mM, BSA al 0,01 %, Tween20 al 0,01 %, pH 6,0) y se añadió. Se recogieron los sobrenadantes después de la centrifugación (10 min, 4000 rpm, 0°C) y se determinó la actividad proteica utilizando un ensayo colorimétrico basado en el método de 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 los grupos α-amino libres y por lo tanto la actividad de la proteasa se puede medir como un aumento de la absorbancia. Los primeros 500 µl de cada sobrenadante se filtran a través de un filtro Microcon de 100 kDa mediante centrifugado (60 min, 11.000 rpm, 5°C). Las muestras se diluyen 10 veces en agua desionizada y 25 µl de cada muestra se cargan en una placa de microtitulación de 96 pocillos (5 replicados). Finalmente, 200 µl de reactivo OPA se dispensan en todos los pocillos, la placa se agita (10 s, 750 rpm) y la absorbancia se mide a 340 nm. El nivel de actividad proteasa se calcula como la diferencia entre la absorbancia en la muestra tratada con enzima y en la muestra en blanco, y se expresa en el factor de dilución OD _ {x}.

Los resultados se proporcionan en el ejemplo 4 más adelante

Cepas

[0367] La secuencia de nucleótidos que codifica la proteasa S1 1 de *Saccharopolyspora erythraea* fue publicado por Oliynyk y col. En "Complete genome sequence of the erythromycin-producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea* NRRL23338", 2007, Nat. Biotechnol. 25: 447-453 y el gen se envió a EMBL/GenBank bajo el número de acceso EMBL: AM420293. Según Oliynyk, "la cepa utilizada, NRRL23338, es la forma original de la cepa tipo de *S. erythraea* NRRL2338, que ahora está en la lista como NRRL23338 blanco en la base de datos NRRL". La base de datos NRRL indica (bajo el número B-24071 de NRRL que corresponde al NRRL 23338 blanco) que la "variante de la colonia blanca fue aislada del crecimiento de la ampolla desde la segunda liofilización". La referencia para NRRL2338 se refiere a EE. UU. 2.653.899 donde se indica que la muestra original de *S. erythraea* NRRL2338 se obtuvo como una muestra de suelo de Ilongo City, Islas Filipinas en o antes de 1952.

Ejemplo 1: Construcción de una cepa de *Bacillus subtilis* para la expresión de la proteasa S1 1 de *Saccharopolyspora erythraea*

[0368] Basándose en la secuencia de nucleótidos publicada identificada como SEQ ID NO: 1, un gen sintético que tiene SEQ ID NO: 3 fue sintetizado por Gene Art (GENEART AG BioPark, Josef-Engert-Str. 11,93053, Regensburg, Alemania). El gen sintético se subclonó usando sitios de restricción ClaI y MluI en un vector de expresión de *Bacillus* como se describe en el ejemplo 1 de PCT/EP11/064585. Los transformantes se seleccionaron en placas LB suplementadas con 6 µg de cloranfenicol por ml.

[0369] El clon recombinante de *Bacillus subtilis* que contenía el constructo de expresión integrado fue seleccionado y designado *Saccharopolyspora erythraea* S1-1. Se cultivó en una tabla giratoria de agitación en matraces de Erlenmeyer de 500 ml que contenían cada uno 100 ml de medio con base de caseína suplementados con 34 mg/l de cloranfenicol. El clon se cultivó durante 3 días a 37 ° C. Se recogieron los sobrenadantes que contenían la enzima y se purificó la enzima como se describe en el ejemplo 2. La peptidasa purificada se designó proteasa S1 1 de *Saccharopolyspora erythraea*.

Ejemplo 2: Purificación de la proteasa S1 1 de *Saccharopolyspora erythraea* de la cepa *Saccharopolyspora erythraea* S1-1.

[0370] El caldo de *Saccharopolyspora erythraea* S1-1 se centrifugó (20000 x g, 20 min) y el sobrenadante se decantó cuidadosamente desde el precipitado. El sobrenadante se filtró a través de una unidad de filtración de Nalgene de 0,2 µm con el fin de eliminar el resto de las células huésped de *Bacillus*. Se añadió sulfato de amonio sólido al filtrado de 0,2 µm hasta una concentración final de sulfato de amonio de 1,4 M (NH₄)₂SO₄. El filtrado de 0,2 µm ajustado de sulfato de amonio se aplicó a una columna Phenyl Toyopearl 650S (de

TosoHaas) equilibrada en H₃BO₃ 100 mM, MES/NaOH 10 mM, CaCl₂ 2 mM, (NH₄)₂SO₄ 1,4 M, pH 6,0. Después de lavar la columna extensamente con el tampón de equilibrado, la proteasa se eluyó con un gradiente (NH₄)₂SO₄ lineal (1,4 -> 0M) en el mismo tampón en tres volúmenes de columna. Las fracciones de la columna se analizaron respecto a la actividad de proteasa (utilizando el ensayo Suc-AAPF-pNA a pH 9). El pico de proteasa se agrupó y se transfirió a H₃BO₃ 100 mM, MES/NaOH 10 mM, CaCl₂ 2 mM, pH 6,0 en una columna Sephadex G25 (de GE Healthcare). La enzima transferida con Sephadex G25 era ligeramente turbia y se filtró a través de una unidad de filtración de 0,2 µm de Nalgene. El pH de la solución enzimática filtrada se ajustó hasta pH 4,5 con CH₃COOH al 20 % y la solución se aplicó a una columna SP-sepharose FF (de GE Healthcare) equilibrada en CH₃COOH/NaOH 20 mM, CaCl 1 mM₂, pH 4,5. Después de lavar la columna extensamente con el tampón de equilibrado, la proteasa se eluyó con un gradiente lineal de NaCl (0 -> 0,5 M) en el mismo tampón en cinco volúmenes de columna. Las fracciones de la columna se analizaron respecto a la actividad de proteasa (utilizando el ensayo Suc-AAPF-pNA a pH 9). El pico de proteasa se agrupó y se transfirió a ácido succínico/NaOH 10 mM, pH 3,5 en una columna Sephadex G25 (de GE Healthcare). La enzima transferida de Sephadex G25 se aplicó a una columna SOURCE S (de GE Healthcare) equilibrada en ácido succínico/NaOH 10 mM, pH 3,5. Después de lavar la columna extensamente con el tampón de equilibrado, la proteasa se eluyó con un gradiente lineal de NaCl (0 -> 0,5 M) en el mismo tampón en treinta volúmenes de columna. Las fracciones de la columna se analizaron para determinar la actividad de proteasa (usando el ensayo Suc-AAPF-pNA a pH 9) y las fracciones activas se analizaron adicionalmente mediante SDS-PAGE. Las fracciones en las que solo se vio una banda en el gel de SDS-PAGE teñido con coomassie, se agruparon y el pH se ajustó a pH 5,0 con NaOH al 3 %. El grupo ajustado de la columna SOURCE S era la preparación purificada y se usó para caracterización adicional.

Ejemplo 3: Caracterización de la proteasa S1 1 de *Saccharopolyspora erythraea*

[0371] El ensayo Suc-AAPF-pNA se utilizó 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 se diluyó 10 veces en los diferentes tampones de ensayo para alcanzar los valores de pH de estos tampones y después se incubó durante 2 horas a 37°C. Después de la incubación, el pH de las incubaciones de proteasa se transfirió al mismo valor de pH, antes del ensayo de actividad residual, mediante dilución en el tampón de ensayo pH 10,0. El ensayo de Protazyme AK se utilizó para obtener el perfil temperatura-actividad a pH 7,0. El ensayo Suc-AAPX-pNA y diez diferentes sustratos Suc-AAPX-pNA se utilizaron para obtener la especificidad de P1 de las enzimas a pH 9,0.

[0372] Los resultados se muestran en las tablas 2-5 a continuación. En la tabla 2, las actividades son relativas al pH óptimo para la enzima. En la tabla 3, las actividades son actividades residuales relativas a una muestra, que se mantuvo en condiciones estables (5 °C, pH 9,0). En la Tabla 4, las actividades son relativas a la temperatura óptima a pH 7,0 para la enzima. En la Tabla 5, las actividades son relativas al mejor sustrato (Suc-AAPF-pNA) para la enzima.

40

Tabla 2: Perfil de actividad de pH a 25 °C

pH	Proteasa S1 1 de <i>Saccharopolyspora erythraea</i>	Proteasa 10R
2	0,00	
3	0,00	0,00
4	0,02	0,02
5	0,09	0,07
6	0,26	0,21
7	0,45	0,44
8	0,74	0,67
9	0,96	0,88
10	1,00	1,00
11	1,00	0,93

Tabla 3: Perfil de estabilidad de pH (actividad residual después de 2 horas a 37 ° C)

pH	Proteasa S1 1 de <i>Saccharopolyspora erythraea</i>	Proteasa 10R
2	0,98	0,78
3	0,99	1,03
4	0,99	0,99
5	1,02	1,00
6	0,96	1,03
7	1,00	1,01
8	0,99	0,98
9	0,99	0,99

10	0,96	0,99
11	0,95	0,86
Después de 2 horas a 5 °C	1,00 (a pH 9)	1,00 (a pH 9)

Tabla 4: Perfil de actividad de temperatura a pH 7,0 o pH 6,5

Temperatura (° C)	Proteasa S1 1 de <i>Saccharopolyspora erythraea</i> (pH 7)	Proteasa 10R (pH 6,5)
15	0,01	0,01
25	0,01	0,02
37	0,04	0,06
50	0,10	0,13
60	0,19	0,35
70	0,59	0,96
80	1,00	1,00
90	0,16	0,18

5 Tabla 5: Especificidad P1 en sustratos Suc-AAPX-pNA a pH 9,0

Suc-AAPX-pNA	Proteasa S1 1 de <i>Saccharopolyspora erythraea</i>	Proteasa 10R
Suc - AAPA - pNA	0,03	0,13
Suc - AAPR - pNA	0,08	0,09
Suc - AAPD - pNA	0,00	0,00
Suc - AAPV - pNA	0,01	0,01
Suc - AAPM - pNA	0,40	0,78
Suc - AAPL - pNA	0,19	0,18
Suc - AAPK - pNA	0,04	0,08
Suc - AAPF - pNA	1,00	1,00

10 [0373] La actividad de pH en el sustrato Suc-AAPF-pNA, el perfil de estabilidad de pH (actividad residual después de 2 horas a 37 °C), el perfil de actividad de temperatura en Protazyme AK a pH 7,0 y la especificidad de P1 en 10 sustratos Suc-AAPF -pNA a pH 9,0 para la proteasa S1 1 de *Saccharomonospora erythraea* en comparación con los datos para la proteasa 10R también se muestran en las figuras 1 a 4.

15 Otras características de la proteasa S1 1 de *Saccharopolyspora erythraea*

15 [0374]

Inhibidor: PMSF.

La determinación de la secuencia N-terminal fue: YNVVGGD.

El peso molecular relativo determinado mediante SDS - PAGE fue aprox. $M_r = 20$ kDa.

20 El peso molecular determinado mediante análisis de peso molecular intacto fue 19337,5 Da.

La secuencia madura a partir de los datos de MS - EDMAN (y tal como se deduce de SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 3):

YNVVGGDAYYMGGRCVSVRSSSGQAGFVTAGHCGTRGTAVSGYNQVAMGSFQGSFPNN

DYAWVSVNSNWTPQPWVNLNYSARVVSAGSSAAPVGSICRSGSTTGWHCQSVQALNQTVRYA

EGTVYGLTRTNVCAEPGDSGGSFISGNQAQGMTSGGSGNCSSGGTTYFQPVNEALSAYGLSLVR

G (SEQ ID NO: 5).

El peso molecular calculado de esta secuencia madura era 19336,9 Da.

25 **Ejemplo 4: Actividad de proteasa en ensayo de harina de soja y maíz (ensayo de SMM)**

30 [0375] Se utilizó un ensayo de harina de soja y maíz para describir la actividad de las proteasas sobre un sustrato relevante en piensos para animales. Los resultados se muestran a continuación en la tabla 6 y en la figura 5. La actividad proteolítica de la proteasa S1 de *Saccharopolyspora erythraea* en la harina de soja y maíz aumenta con el pH creciente desde pH 3 hasta pH 7, y la actividad en todo el rango de pH es mayor que para la proteasa 10R indicando que la proteasa S1 1 de *Saccharopolyspora erythraea* podría ser más eficaz en la hidrólisis de la proteína en el tracto gastrointestinal de, p. ej., cerdos y aves de corral.

TABLA 6 Actividad de proteasa en harina de soja y maíz a pH 3,0, 4,0, 5,0, 6,0 y 7,0

pH	Proteasa S1 1 de <i>Saccharopolyspora erythraea</i>		Proteasa 10R	
	Promedio	Desviación estándar	Promedio	Desviación estándar
3,0	0,37	0,01	0,22	0,06
4,0	0,36	0,03	0,30	0,10
5,0	1,32	0,07	0,71	0,01
6,0	2,74	0,06	1,81	0,14
7,0	3,54	0,06	2,92	0,11

5 Ejemplo 5: Actividad proteolítica en la digesta en buche, molleja e íleon de pollos de engorde

[0376] Se recolectó el material de digesta del buche, la molleja y el íleon de pollos de engorde de 21 días alimentados con una dieta de soja y maíz; liofilizado y molido utilizando un molinillo de café. Las muestras de molienda se suspendieron (47 % p/v) en los siguientes tampones y se dejaron hidratar a 4°C durante la noche (sin agitación):

Tampón del buche:	HEPES 100 mM, CaCl ₂ · 2H ₂ O 1 mM, KCl 150 mM, Triton X - 100 al 0,01 %, ajustado a pH 5 usando HCl
Tampón de la molleja:	ácido succínico 100 mM, CaCl ₂ · 2H ₂ O 1 mM, KCl 150 mM, Triton X - 100 al 0,01 %, ajustado a pH 1,67 usando HCl
Tampón del íleon:	HEPES 100 mM, CaCl ₂ · 2H ₂ O 1 mM, KCl 150 mM, Triton X - 100 al 0,01 %, ajustado a pH 7,2 usando HCl

[0377] El pH resultante fue: pH 5 en muestras de buche; pH 3 en muestras de molleja; y pH 7 en muestras de íleon. Las suspensiones se calentaron a 40 ° C y se dispensaron en tubos de 1 ml mantenidos a 40 ° C. Tres tubos que representan el blanco (T₀) se centrifugaron inmediatamente (3000 x g, 0 ° C, 10 min) y los sobrenadantes se congelaron. Tanto la enzima (200 mg de proteína enzimática/kg de sustrato) en 50 µl de tampón de acetato de sodio 100 mM (9,565 g/l de NaOAc, 1,75 g/l de ácido acético, CaCl₂ 5 mM, BSA al 0,01 %, Tween20 al 0,01 %, pH 6,0) como simplemente el tampón de acetato de sodio (50 µl) para las muestras en blanco se añadieron a los tubos y se incubaron las muestras de buche e íleon durante 3 horas (T₃) mientras que las muestras de molleja se incubaron durante 1 hora (T₁) a 40 ° C a la vez que se agitaban (500 rpm). Las muestras se centrifugaron (3000 x g, 0 ° C, 10 min) y los sobrenadantes se recuperaron y se congelaron. La actividad proteolítica se determinó analizando aminas primarias usando el ensayo de o-ftaldialdehído (OPA).

[0378] Los resultados se muestran en la Tabla 7. Para cada uno de los tipos de digesta (buche, molleja e íleon) hubo una diferencia significativa entre el nivel de aminas primarias solubles en la muestra en blanco T₀ y las muestras en blanco incubadas durante 1 o 3 horas. Esta diferencia puede atribuirse a la solubilización y a la actividad de proteasas presentes en el sustrato y que se originan ya sea a partir de las materias primas de la dieta o del animal. La proteasa S1 1 de *Saccharopolyspora erythraea* aumentó significativamente el nivel de aminas primarias solubles en muestras de buche e íleon en comparación con la muestra en blanco. El aumento observado por la proteasa S1 1 de *Saccharopolyspora erythraea* era numéricamente igual o mayor que el de la proteasa 10R, lo que indica un potencial proteolítico ligeramente superior para esta proteasa en el sustrato dado.

TABLA 7 Actividad proteolítica de la proteasa S1 1 de *Saccharopolyspora erythraea* comparada con la proteasa 10R cuando se incubó con digesta de pollos de engorde y se expresó como nivel de aminas primarias medidas mediante el ensayo de OPA (OD340 x factor de dilución)

Tratamiento	Buche (3 horas)	Molleja (1 hora)	Íleon (3 horas)
Blanco (T ₀)	2,21 ± 0,02 ^c	2,95 ± 0,02 ^b	9,37 ± 0,08 ^b
Blanco	3,54 ± 0,02 ^b	3,85 ± 0,13 ^a	14,42 ± 0,52 ^a
Proteasa 10R	3,85 ± 0,07 ^a	3,87 ± 0,13 ^a	14,74 ± 0,16 ^a
Proteasa S1 1 de <i>Saccharopolyspora erythraea</i>	3,87 ± 0,10 ^a	3,89 ± 0,04 ^a	14,84 ± 0,14 ^a

^{a b c d} Los valores dentro de una columna que no están conectados por las mismas letras de superíndice son estadísticamente diferentes según lo determinado mediante la prueba de Tukey Kramer ($\alpha = 0,05$) proporcionada por el procedimiento ANOVA (SAS Institute Inc.).

40 Ejemplo 6: Termoestabilidad

[0379] Una alícuota de la muestra de proteína proteasa (purificada como se describe en el ejemplo 2) se

desala o se cambia de tampón a acetato de Na 20 mM, pH 4,0 utilizando una columna pre-empaquetada PD-10 o dializada contra 2 x 500 ml de acetato de Na, pH 4,0 a 4 °C en un paso de 2-3 h seguido por un paso de una noche. La muestra es de 0,45 µm filtrada y diluida con tampón a aprox. 2 A280 unidades. El tampón de diálisis se utiliza como referencia en calorimetría diferencial de barrido (DSC). Las muestras se desgasifican usando succión al vacío y agitando durante aprox. 10 minutos.

[0380] Se realiza un barrido DSC en un MicroCal VP-DSC a una velocidad de barrido constante de 1,5 °C/min de 20-90°C. El manejo de datos se realiza utilizando el software MicroCal Origin (versión 4.10), y la temperatura de desnaturalización, T_d (también llamada temperatura de fusión, T_f) se define como la temperatura en el vértice del pico en el termograma.

Ejemplo 7: Estabilidad de vapor

[0381] La actividad residual de la proteasa después del tratamiento con vapor se puede evaluar usando el siguiente ensayo.

[0382] En estos experimentos se utiliza un montaje modificado por el que el vapor se suministra desde un generador de vapor y se introduce en 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 desciende 4 °C. La incubación se realiza durante 30 segundos a la vez que la temperatura permanece aproximadamente constante a 90°C. Posteriormente, la placa se retira rápidamente de la caja, las muestras se colocan sobre hielo, se vuelven a suspender y se evalúan con respecto a la actividad de proteasa usando los ensayos Suc-AAPF-pNA u o-ftaldialdehído (OPA). Cada muestra de enzima se compara con una muestra similar que no ha sido tratada con vapor para calcular la actividad residual.

Ejemplo 8: Pruebas de estabilidad de granulación

[0383] La granulación enzimática se realiza de una manera como la que se describe en patente EE. UU. n.º 4.106.991, ejemplo 1. El granulado obtenido se seca en un lecho fluidificado hasta un contenido de agua por debajo del 1 % y se tamiza para obtener un producto con el intervalo de partículas de 250 µm a 850 µm. Finalmente, el producto se recubre con aceite de palma y carbonato de calcio de una manera como la que se describe en patente EE. UU. n.º 4.106.991, ejemplo 22.

[0384] Se premezclan aproximadamente 50 g de granulado enzimático con 10 kg de pienso durante 10 minutos en una pequeña mezcladora horizontal. Esta premezcla se mezcla con 90 kg de pienso durante 10 minutos en una mezcladora horizontal más grande. Desde la mezcladora el pienso se lleva al acondicionador (una mezcladora en cascada con inyección de vapor) a una velocidad de aproximadamente 300 kg/hora. El acondicionador calienta el pienso a 95 °C (medido a la salida) inyectando vapor. El tiempo de permanencia en el acondicionador es de 30 segundos. Desde el acondicionador el pienso se lleva a una prensa Simon Heesen equipada con troquel horizontal de 3,0x35 mm y se prensa en gránulos con una longitud de alrededor de 15 mm. Después del prensado, los gránulos se colocan en un refrigerador de aire y se enfrían durante 15 minutos.

[0385] La actividad de proteasa se mide utilizando el ensayo Suc-AAPF-pNA antes de la formación de gránulos y en los gránulos de pienso después de la granulación. La estabilidad de la formación de gránulos se determina comparando la actividad de proteasa en el pienso granulado con respecto a la actividad en el pienso no granulado.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0386]

<110> Novozymes A/S

<120> Proteasas, su uso y producción

<130> 12159-WO-PCT

<150> EP 12152669.3

<151> 2012-01-26

<160> 13

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

ES 2 644 007 T3

<211> 1122
 <212> DNA
 <213> Saccharopolyspora erythraea

5 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1122)

10 <220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(84)

15 <220>
 <221> mat_peptide
 <222> (553)..(1122)

<400> 1

atg aag cga aca att	cgg ctg gcc ggt gtg	gcc gtg ctc gcg gcg	45
Met Lys Arg Thr Ile	Arg Leu Ala Gly Val	Ala Val Leu Ala Ala	
	-180	-175	-170
ggc acc atc gcc gcg	atc ggc gca cca acc	gtc ggc gcc gag ccg	90
Gly Thr Ile Ala Ala	Ile Gly Ala Pro Thr	Val Gly Ala Glu Pro	
	-165	-160	-155
gtg tcg ccc gac ctc	gtc gcg gcg atg gag	cgc gac ctc ggc atc	135
Val Ser Pro Asp Leu	Val Ala Ala Met Glu	Arg Asp Leu Gly Ile	
	-150	-145	-140
tcc gcc cag cag gcg	cac gcg cgg ctg gcg	cag gag gcc acg gcg	180
Ser Ala Gln Gln Ala	His Ala Arg Leu Ala	Gln Glu Ala Thr Ala	
	-135	-130	-125
atg cgg gcc gac gcc	gag ctg agc cgc tcg	ctg ggc gag agc ttc	225
Met Arg Ala Asp Ala	Glu Leu Ser Arg Ser	Leu Gly Glu Ser Phe	
	-120	-115	-110
ggc ggt tcc tac ttc	gac gcg gcg cgc ggc	aag ctc gtc gtc ggg gtg	273
Gly Gly Ser Tyr Phe	Asp Ala Ala Arg Gly	Lys Leu Val Val Gly Val	
	-105	-100	-95
acc gag cag gcc gat	gcg gcg aag gtg cgg	gcg gga gcc gag gcc	321
Thr Glu Gln Ala Asp	Ala Ala Lys Val Arg	Ala Ala Gly Ala Glu Ala	
	-90	-85	-80
gcg gtc gtg ccg aac	agc ctg cgc gaa ctg	gac gcc acc aag gcg gcg	369

20

ES 2 644 007 T3

Ala	Val	Val	Pro	Asn	Ser	Leu	Arg	Glu	Leu	Asp	Ala	Thr	Lys	Ala	Ala		
		-75					-70					-65					
ctg	gac	gcg	atg	gac	gct	gcg	gcg	ccc	gcc	tcg	gtg	acc	ggc	tgg	tac		417
Leu	Asp	Ala	Met	Asp	Ala	Ala	Ala	Pro	Ala	Ser	Val	Thr	Gly	Trp	Tyr		
	-60					-55				-50							
gtc	gac	gtg	ccc	agc	agc	agc	gtg	gtc	gtc	tcc	gtc	aac	ggg	cgc	gac		465
Val	Asp	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Val	Val	Val	Ser	Val	Asn	Gly	Arg	Asp		
-45				-40						-35					-30		
gcc	gcg	acc	gac	gcc	ttc	ctg	gac	aag	gcg	aag	gcc	gcc	ggc	gac	tcg		513
Ala	Ala	Thr	Asp	Ala	Phe	Leu	Asp	Lys	Ala	Lys	Ala	Ala	Gly	Asp	Ser		
				-25				-20						-15			
gtg	cgc	gtg	cag	gag	gtc	gcc	gag	tcg	ccg	cgc	ccg	ctc	tac	aac	gtg		561
Val	Arg	Val	Gln	Glu	Val	Ala	Glu	Ser	Pro	Arg	Pro	Leu	Tyr	Asn	Val		
			-10					-5				-1	1				
gtc	ggc	ggc	gac	gcc	tac	tac	atg	ggc	gga	cgc	tgc	tcg	gtg	ggc	ttc		609
Val	Gly	Gly	Asp	Ala	Tyr	Tyr	Met	Gly	Gly	Arg	Cys	Ser	Val	Gly	Phe		
	5					10					15						
tcg	gtg	cgc	tcg	tcc	tcc	ggc	cag	gcg	ggc	ttc	gtc	acc	gcc	ggg	cac		657
Ser	Val	Arg	Ser	Ser	Ser	Gly	Gln	Ala	Gly	Phe	Val	Thr	Ala	Gly	His		
20					25					30					35		
tgc	ggc	acc	cgc	ggc	acg	gcg	gtc	tcc	ggc	tac	aac	cag	gtc	gcc	atg		705
Cys	Gly	Thr	Arg	Gly	Thr	Ala	Val	Ser	Gly	Tyr	Asn	Gln	Val	Ala	Met		
				40					45					50			
ggc	tcg	ttc	cag	ggc	tcg	tcc	ttc	ccg	aac	aac	gac	tac	gcc	tgg	gtc		753
Gly	Ser	Phe	Gln	Gly	Ser	Ser	Phe	Pro	Asn	Asn	Asp	Tyr	Ala	Trp	Val		
			55					60					65				
tcg	gtg	aac	tcg	aac	tgg	acg	ccg	cag	ccg	tgg	gtg	aac	ctc	tac	aac		801
Ser	Val	Asn	Ser	Asn	Trp	Thr	Pro	Gln	Pro	Trp	Val	Asn	Leu	Tyr	Asn		
		70					75					80					
ggc	tcg	gcc	cgc	gtg	gtg	tcg	ggc	tcg	tcg	gcg	gcg	ccg	gtg	ggc	agc		849
Gly	Ser	Ala	Arg	Val	Val	Ser	Gly	Ser	Ser	Ala	Ala	Pro	Val	Gly	Ser		
	85					90				95							
tcg	atc	tgc	cgt	tcc	ggt	tcc	acg	acc	ggc	tgg	cac	tgc	ggc	agc	gtg		897
Ser	Ile	Cys	Arg	Ser	Gly	Ser	Thr	Thr	Gly	Trp	His	Cys	Gly	Ser	Val		
100					105					110					115		
cag	gcg	ctg	aac	cag	acc	gtc	cgc	tac	gcg	gaa	ggc	acg	gtc	tac	ggc		945
Gln	Ala	Leu	Asn	Gln	Thr	Val	Arg	Tyr	Ala	Glu	Gly	Thr	Val	Tyr	Gly		
				120					125					130			
ctg	acc	cgc	acc	aac	gtc	tgc	gcc	gag	ccg	ggc	gac	tcc	ggc	ggc	tcc		993
Leu	Thr	Arg	Thr	Asn	Val	Cys	Ala	Glu	Pro	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Ser		
			135				140						145				
ttc	atc	agc	ggc	aac	cag	gcc	cag	ggc	atg	acc	tcg	ggc	ggc	tcg	ggc		1041
Phe	Ile	Ser	Gly	Asn	Gln	Ala	Gln	Gly	Met	Thr	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly		
		150				155						160					
aac	tgc	agc	tcg	ggc	ggc	acg	acc	tac	ttc	cag	ccc	gtc	aac	gag	gcg		1089
Asn	Cys	Ser	Ser	Gly	Gly	Thr	Thr	Tyr	Phe	Gln	Pro	Val	Asn	Glu	Ala		
	165					170					175						

ctg agc gcc tac ggc ctg agc ctg gtc agg ggt
Leu Ser Ala Tyr Gly Leu Ser Leu Val Arg Gly
180 185 190

1122

<210> 2
<211> 374
5 <212> PRT
<213> Saccharopolyspora erythraea

<400> 2

ES 2 644 007 T3

Met Lys Arg Thr Ile Arg Leu Ala Gly Val Ala Val Leu Ala Ala
 -180 -175 -170

Gly Thr Ile Ala Ala Ile Gly Ala Pro Thr Val Gly Ala Glu Pro
 -165 -160 -155

Val Ser Pro Asp Leu Val Ala Ala Met Glu Arg Asp Leu Gly Ile
 -150 -145 -140

Ser Ala Gln Gln Ala His Ala Arg Leu Ala Gln Glu Ala Thr Ala
 -135 -130 -125

Met Arg Ala Asp Ala Glu Leu Ser Arg Ser Leu Gly Glu Ser Phe
 -120 -115 -110

Gly Gly Ser Tyr Phe Asp Ala Ala Arg Gly Lys Leu Val Val Gly Val
 -105 -100 -95

Thr Glu Gln Ala Asp Ala Ala Lys Val Arg Ala Ala Gly Ala Glu Ala
 -90 -85 -80

Ala Val Val Pro Asn Ser Leu Arg Glu Leu Asp Ala Thr Lys Ala Ala
 -75 -70 -65

Leu Asp Ala Met Asp Ala Ala Ala Pro Ala Ser Val Thr Gly Trp Tyr
 -60 -55 -50

Val Asp Val Pro Ser Ser Ser Val Val Val Ser Val Asn Gly Arg Asp
 -45 -40 -35 -30

Ala Ala Thr Asp Ala Phe Leu Asp Lys Ala Lys Ala Ala Gly Asp Ser
 -25 -20 -15

Val Arg Val Gln Glu Val Ala Glu Ser Pro Arg Pro Leu Tyr Asn Val
 -10 -5 -1 1

Val Gly Gly Asp Ala Tyr Tyr Met Gly Gly Arg Cys Ser Val Gly Phe
 5 10 15

ES 2 644 007 T3

Ser Val Arg Ser Ser Ser Gly Gln Ala Gly Phe Val Thr Ala Gly His
20 25 30 35

Cys Gly Thr Arg Gly Thr Ala Val Ser Gly Tyr Asn Gln Val Ala Met
40 45 50

Gly Ser Phe Gln Gly Ser Ser Phe Pro Asn Asn Asp Tyr Ala Trp Val
55 60 65

Ser Val Asn Ser Asn Trp Thr Pro Gln Pro Trp Val Asn Leu Tyr Asn
70 75 80

Gly Ser Ala Arg Val Val Ser Gly Ser Ser Ala Ala Pro Val Gly Ser
85 90 95

Ser Ile Cys Arg Ser Gly Ser Thr Thr Gly Trp His Cys Gly Ser Val
100 105 110 115

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

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

Phe Ile Ser Gly Asn Gln Ala Gln Gly Met Thr Ser Gly Gly Ser Gly
150 155 160

Asn Cys Ser Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Phe Gln Pro Val Asn Glu Ala
165 170 175

Leu Ser Ala Tyr Gly Leu Ser Leu Val Arg Gly
180 185 190

<210> 3
<211> 1119
5 <212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Constructo sintético

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1119)

15 <220>
<221> sig_peptide

<222> (1)..(81)

<220>

<221> mat_peptide

5 <222> (550)..(1119)

<400> 3

ES 2 644 007 T3

atg aag aaa ccg ttg ggg aaa att gtc gca agc acc gca cta ctc	45
Met Lys Lys Pro Leu Gly Lys Ile Val Ala Ser Thr Ala Leu Leu	
-180 -175 -170	
att tct gtt gct ttt agt tca tcg atc gca tcg gct gaa ccg gta	90
Ile Ser Val Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Ser Ala Glu Pro Val	
-165 -160 -155	
tct cct gac ttg gtt gct gcg atg gag cgc gat ctt gga atc tct	135
Ser Pro Asp Leu Val Ala Ala Met Glu Arg Asp Leu Gly Ile Ser	
-150 -145 -140	
gct cag caa gcg cat gct cgc tta gct cag gaa gca act gct atg	180
Ala Gln Gln Ala His Ala Arg Leu Ala Gln Glu Ala Thr Ala Met	
-135 -130 -125	
cgt gcg gat gct gaa ttg tct cgc tca ttg gga gaa tct ttt gga	225
Arg Ala Asp Ala Glu Leu Ser Arg Ser Leu Gly Glu Ser Phe Gly	
-120 -115 -110	
ggg tct tac ttc gat gca gca cgc ggt aaa ctt gtt gta ggt gta aca	273
Gly Ser Tyr Phe Asp Ala Ala Arg Gly Lys Leu Val Val Gly Val Thr	
-105 -100 -95	
gaa caa gca gac gct gct aag gta cgc gct gcg gga gct gaa gcg gca	321
Glu Gln Ala Asp Ala Ala Lys Val Arg Ala Ala Gly Ala Glu Ala Ala	
-90 -85 -80	
gtt gtt cct aac tct tta cgt gaa ttg gat gct aca aaa gca gca tta	369
Val Val Pro Asn Ser Leu Arg Glu Leu Asp Ala Thr Lys Ala Ala Leu	
-75 -70 -65	
gat gca atg gac gca gca gct cct gcg agc gtt act gga tgg tat gtt	417
Asp Ala Met Asp Ala Ala Ala Pro Ala Ser Val Thr Gly Trp Tyr Val	
-60 -55 -50 -45	
gat gta cca tca tct tca gta gtt gta tct gta aat ggt cgc gat gca	465
Asp Val Pro Ser Ser Ser Val Val Val Ser Val Asn Gly Arg Asp Ala	
-40 -35 -30	
gca aca gat gcg ttc ctt gac aaa gct aag gct gct gga gac tca gtt	513
Ala Thr Asp Ala Phe Leu Asp Lys Ala Lys Ala Ala Gly Asp Ser Val	
-25 -20 -15	
cgc gta caa gaa gtt gcg gaa tca ccg cgt cca ttg tac aat gtt gta	561
Arg Val Gln Glu Val Ala Glu Ser Pro Arg Pro Leu Tyr Asn Val Val	
-10 -5 -1 1	
ggg ggc gat gcg tac tat atg gga gga cgc tgt tca gtt ggt ttc tca	609
Gly Gly Asp Ala Tyr Tyr Met Gly Gly Arg Cys Ser Val Gly Phe Ser	
5 10 15 20	
gtt cgc tct agc tct ggc caa gct ggt ttc gta aca gct ggt cat tgc	657
Val Arg Ser Ser Ser Gly Gln Ala Gly Phe Val Thr Ala Gly His Cys	
25 30 35	
ggg act cgc gga aca gct gtt tct ggt tac aat cag gta gct atg ggt	705
Gly Thr Arg Gly Thr Ala Val Ser Gly Tyr Asn Gln Val Ala Met Gly	
40 45 50	

ES 2 644 007 T3

tca ttt caa gga tct tct ttt ccg aac aac gat tat gca tgg gta tct 753
 Ser Phe Gln Gly Ser Ser Phe Pro Asn Asn Asp Tyr Ala Trp Val Ser
 55 60 65

gtt aac tca aac tgg aca cct caa cca tgg gta aac ttg tac aat gga 801
 Val Asn Ser Asn Trp Thr Pro Gln Pro Trp Val Asn Leu Tyr Asn Gly
 70 75 80

agc gct cgt gta gtt agc gga tca tca gct gca cca gtt ggt tct tca 849
 Ser Ala Arg Val Val Ser Gly Ser Ser Ala Ala Pro Val Gly Ser Ser
 85 90 95 100

att tgc cgc tca gga tct aca act ggt tgg cat tgc ggc tct gtt cag 897
 Ile Cys Arg Ser Gly Ser Thr Thr Gly Trp His Cys Gly Ser Val Gln
 105 110 115

gca ctt aac caa act gta cgt tac gct gag ggt act gtt tac ggc ttg 945
 Ala Leu Asn Gln Thr Val Arg Tyr Ala Glu Gly Thr Val Tyr Gly Leu
 120 125 130

act cgt act aac gtt tgt gcg gaa cct ggc gat tct gga ggc tct ttc 993
 Thr Arg Thr Asn Val Cys Ala Glu Pro Gly Asp Ser Gly Gly Ser Phe
 135 140 145

att tct ggt aac cag gca caa ggc atg acg agc ggt gga tct gga aat 1041
 Ile Ser Gly Asn Gln Ala Gln Gly Met Thr Ser Gly Gly Ser Gly Asn
 150 155 160

tgt tct tct gga ggt act acg tac ttt cag cca gtt aac gag gcg ttg 1089
 Cys Ser Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Phe Gln Pro Val Asn Glu Ala Leu
 165 170 175 180

agc gct tac gga ctt agc tta gtt cgt gga 1119
 Ser Ala Tyr Gly Leu Ser Leu Val Arg Gly
 185 190

<210> 4
 <211> 373
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <223> Constructo sintético

<400> 4

Met Lys Lys Pro Leu Gly Lys Ile Val Ala Ser Thr Ala Leu Leu
 -180 -175 -170

Ile Ser Val Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Ser Ala Glu Pro Val
 -165 -160 -155

Ser Pro Asp Leu Val Ala Ala Met Glu Arg Asp Leu Gly Ile Ser
 -150 -145 -140

Ala Gln Gln Ala His Ala Arg Leu Ala Gln Glu Ala Thr Ala Met
 -135 -130 -125

ES 2 644 007 T3

Arg Ala Asp Ala Glu Leu Ser Arg Ser Leu Gly Glu Ser Phe Gly
 -120 -115 -110

Gly Ser Tyr Phe Asp Ala Ala Arg Gly Lys Leu Val Val Gly Val Thr
 -105 -100 -95

Glu Gln Ala Asp Ala Ala Lys Val Arg Ala Ala Gly Ala Glu Ala Ala
 -90 -85 -80

Val Val Pro Asn Ser Leu Arg Glu Leu Asp Ala Thr Lys Ala Ala Leu
 -75 -70 -65

Asp Ala Met Asp Ala Ala Ala Pro Ala Ser Val Thr Gly Trp Tyr Val
 -60 -55 -50 -45

Asp Val Pro Ser Ser Ser Val Val Val Ser Val Asn Gly Arg Asp Ala
 -40 -35 -30

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

Arg Val Gln Glu Val Ala Glu Ser Pro Arg Pro Leu Tyr Asn Val Val
 -10 -5 -1 1

Gly Gly Asp Ala Tyr Tyr Met Gly Gly Arg Cys Ser Val Gly Phe Ser
 5 10 15 20

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

Gly Thr Arg Gly Thr Ala Val Ser Gly Tyr Asn Gln Val Ala Met Gly
 40 45 50

Ser Phe Gln Gly Ser Ser Phe Pro Asn Asn Asp Tyr Ala Trp Val Ser
 55 60 65

Val Asn Ser Asn Trp Thr Pro Gln Pro Trp Val Asn Leu Tyr Asn Gly
 70 75 80

Ser Ala Arg Val Val Ser Gly Ser Ser Ala Ala Pro Val Gly Ser Ser
 85 90 95 100

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

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

ES 2 644 007 T3

Thr Arg Thr Asn Val Cys Ala Glu Pro Gly Asp Ser Gly Gly Ser Phe
135 140 145

Ile Ser Gly Asn Gln Ala Gln Gly Met Thr Ser Gly Gly Ser Gly Asn
150 155 160

Cys Ser Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Phe Gln Pro Val Asn Glu Ala Leu
165 170 175 180

Ser Ala Tyr Gly Leu Ser Leu Val Arg Gly
185 190

<210> 5
<211> 190
5 <212> PRT
<213> Saccharopolyspora erythraea

<220>
<221> mat_peptide
10 <222> (1)..(190)

<400> 5

ES 2 644 007 T3

Tyr Asn Val Val Gly Gly Asp Ala Tyr Tyr Met Gly Gly Arg Cys Ser
1 5 10 15

Val Gly Phe Ser Val Arg Ser Ser Ser Gly Gln Ala Gly Phe Val Thr
20 25 30

Ala Gly His Cys Gly Thr Arg Gly Thr Ala Val Ser Gly Tyr Asn Gln
35 40 45

Val Ala Met Gly Ser Phe Gln Gly Ser Ser Phe Pro Asn Asn Asp Tyr
50 55 60

Ala Trp Val Ser Val Asn Ser Asn Trp Thr Pro Gln Pro Trp Val Asn
65 70 75 80

Leu Tyr Asn Gly Ser Ala Arg Val Val Ser Gly Ser Ser Ala Ala Pro
85 90 95

Val Gly Ser Ser Ile Cys Arg Ser Gly Ser Thr Thr Gly Trp His Cys
100 105 110

Gly Ser Val Gln Ala Leu Asn Gln Thr Val Arg Tyr Ala Glu Gly Thr
115 120 125

Val Tyr Gly Leu Thr Arg Thr Asn Val Cys Ala Glu Pro Gly Asp Ser
130 135 140

Gly Gly Ser Phe Ile Ser Gly Asn Gln Ala Gln Gly Met Thr Ser Gly
145 150 155 160

Gly Ser Gly Asn Cys Ser Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Phe Gln Pro Val
165 170 175

Asn Glu Ala Leu Ser Ala Tyr Gly Leu Ser Leu Val Arg Gly
180 185 190

5 <210> 6
<211> 27
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> señal de secreción de Bacillus lentus

<220>

ES 2 644 007 T3

<221> SIGNAL

<222> (1)..(27)

<400> 6

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 Ile Ala Ser Ala
20 25

5 <210> 7
 <211> 1596
 <212> DNA
 <213> Nocardiosis sp. NRRL 18262

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

15 <220>
 <221> sig_peptide
 <222> (318)..(404)

20 <220>
 <221> mat_peptide
 <222> (900)..(1463)

<400> 7

acgtttggta cgggtaccgg tgtccgcatg tggccagaat gcccccttgc gacagggaac 60
 ggattcggtc ggtagcgcac cgactccgac aaccgcgagg tggccggtcg cgtcgccacg 120
 ttctgcgacc gtcatgacgac ccatcatcgg gtgacccac cgagctctga atggtccacc 180

ES 2 644 007 T3

gttctgacgg tctttccctc accaaaacgt gcacctatgg ttaggacggt gtttaccgaa 240

tgtctcgggtg 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
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

ES 2 644 007 T3

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 tgc 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 ggttccaggc ggaccgacgg 1493
 Ser Trp Gly Val Arg Leu Arg Thr
 185

tcgtgacctg agtaccaggc gtccccgcgg cttccagcgg cgtccgcacc ggggtgggac 1553

cgggcgtggc cacggcccca cccgtgaccg gaccgcccgg cta 1596

<210> 8
 <211> 382
 <212> PRT
 <213> Nocardiosis sp. NRRL 18262

<400> 8

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

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

5

10

ES 2 644 007 T3

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

 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

ES 2 644 007 T3

Met Leu Pro Lys Lys His Arg Leu Val Ala Arg Met Thr Ala Thr Ala
 1 5 10 15

Met Leu Ala Ala Gly Thr Ala Ala Ala Val Ala Leu Pro Ala Thr Ala
 20 25 30

Glu Thr Val Thr Pro Gln Thr Glu Val Thr Ala Glu Ala Asp Pro Met
 35 40 45

Leu Gln Ala Met Gln Arg Asp Leu Gly Leu Thr Ala Gln Glu Ala Gln
 50 55 60

Gln Arg Leu Glu Gln Glu Ser Val Ala Arg Thr Leu Asp Glu Thr Leu
 65 70 75 80

Arg Ala Lys Leu Gln Asp Asn Phe Gly Gly Ser Tyr Tyr Asp Ala Asp
 85 90 95

Thr Gly Thr Leu Val Val Gly Val Thr Glu Ala Ser Ala Leu Asp Asp
 100 105 110

Val Arg Ala Ala Gly Ala Lys Ala Lys Leu Val Asp Ala Ser Ile Asp

ES 2 644 007 T3

	115					120										125
Glu	Leu	Asn	Thr	Ala	Val	Asp	Arg	Leu	Asp	Arg	Lys	Glu	Ser	Ser	Ala	
	130					135					140					
Pro	Glu	Ser	Val	Thr	Gly	Trp	Tyr	Val	Asp	Val	Lys	Asn	Asn	Ser	Val	
145					150					155					160	
Val	Val	Thr	Thr	Ala	Pro	Gly	Thr	Ala	Ala	Gln	Ala	Glu	Lys	Phe	Val	
				165					170					175		
Ala	Ala	Ser	Gly	Val	Asp	Gly	Asp	Asn	Val	Glu	Ile	Val	Glu	Ser	Thr	
			180					185					190			
Glu	Gln	Pro	Arg	Thr	Phe	Met	Asp	Val	Ile	Gly	Gly	Asn	Ala	Tyr	Tyr	
		195					200					205				
Met	Gly	Asn	Gly	Gly	Arg	Cys	Ser	Val	Gly	Phe	Thr	Val	Gln	Gly	Gly	
	210					215					220					
Phe	Val	Thr	Ala	Gly	His	Cys	Gly	Thr	Thr	Gly	Thr	Ser	Thr	Ser	Ser	
225					230					235					240	
Pro	Ser	Gly	Thr	Phe	Ala	Gly	Ser	Ser	Phe	Pro	Gly	Asn	Asp	Tyr	Ala	
				245					250					255		
Phe	Val	Arg	Thr	Gly	Ser	Gly	Asp	Thr	Leu	Arg	Pro	Trp	Val	Asn	Met	
			260					265					270			
Tyr	Asn	Gly	Ser	Ala	Arg	Val	Val	Ser	Gly	Ser	Ser	Val	Ala	Pro	Val	
		275					280					285				
Gly	Ser	Ser	Ile	Cys	Arg	Ser	Gly	Ser	Thr	Thr	Gly	Trp	His	Cys	Gly	
	290					295					300					
Gln	Val	Gln	Ala	Phe	Asn	Gln	Thr	Val	Arg	Tyr	Ala	Glu	Gly	Thr	Val	
305					310					315					320	
Thr	Gly	Leu	Thr	Arg	Thr	Asn	Val	Cys	Ala	Glu	Pro	Gly	Asp	Ser	Gly	
				325					330					335		
Gly	Ser	Phe	Ile	Ser	Gly	Asn	Gln	Ala	Gln	Gly	Met	Thr	Ser	Gly	Gly	
			340					345					350			
Ser	Gly	Asn	Cys	Thr	Phe	Gly	Gly	Thr	Thr	Tyr	Phe	Gln	Pro	Val	Asn	
		355					360					365				

ES 2 644 007 T3

Glu Val Leu Ser Ala Tyr Asn Leu Arg Leu Ile Thr Gly
370 375 380

<210> 10

<211> 382

5 <212> PRT

<213> Streptomyces sp.

<400> 10

ES 2 644 007 T3

Met Arg His Thr Gly Arg Asn Ala Ile Gly Ala Ala Ile Ala Ala Ser
 1 5 10 15

Ala Leu Ala Phe Ala Leu Val Pro Ser Gln Ala Ala Ala Asn Asp Thr
 20 25 30

Leu Thr Glu Arg Ala Glu Ala Ala Val Ala Asp Leu Pro Ala Gly Val
 35 40 45

Leu Asp Ala Met Glu Arg Asp Leu Gly Leu Ser Glu Gln Glu Ala Gly
 50 55 60

Leu Lys Leu Val Ala Glu His Asp Ala Ala Leu Leu Gly Glu Thr Leu
 65 70 75 80

Ser Ala Asp Leu Asp Ala Phe Ala Gly Ser Trp Leu Ala Glu Gly Thr
 85 90 95

Glu Leu Val Val Ala Thr Thr Ser Glu Ala Glu Ala Ala Glu Ile Thr
 100 105 110

Glu Ala Gly Ala Thr Ala Glu Val Val Asp His Thr Leu Ala Glu Leu
 115 120 125

Asp Ser Val Lys Asp Ala Leu Asp Thr Ala Ala Glu Ser Tyr Asp Thr
 130 135 140

Thr Asp Ala Pro Val Trp Tyr Val Asp Val Thr Thr Asn Gly Val Val
 145 150 155 160

Leu Leu Thr Ser Asp Val Thr Glu Ala Glu Gly Phe Val Glu Ala Ala
 165 170 175

Gly Val Asn Ala Ala Ala Val Asp Ile Gln Thr Ser Asp Glu Gln Pro
 180 185 190

Gln Ala Phe Tyr Asp Leu Val Gly Gly Asp Ala Tyr Tyr Met Gly Gly
 195 200 205

ES 2 644 007 T3

Gly Arg Cys Ser Val Gly Phe Ser Val Thr Gln Gly Ser Thr Pro Gly
 210 215 220

Phe Ala Thr Ala Gly His Cys Gly Thr Val Gly Thr Ser Thr Thr Gly
 225 230 235 240

Tyr Asn Gln Ala Ala Gln Gly Thr Phe Glu Glu Ser Ser Phe Pro Gly
 245 250 255

Asp Asp Met Ala Trp Val Ser Val Asn Ser Asp Trp Asn Thr Thr Pro
 260 265 270

Thr Val Asn Glu Gly Glu Val Thr Val Ser Gly Ser Thr Glu Ala Ala
 275 280 285

Val Gly Ala Ser Ile Cys Arg Ser Gly Ser Thr Thr Gly Trp His Cys
 290 295 300

Gly Thr Ile Gln Gln His Asn Thr Ser Val Thr Tyr Pro Glu Gly Thr
 305 310 315 320

Ile Thr Gly Val Thr Arg Thr Ser Val Cys Ala Glu Pro Gly Asp Ser
 325 330 335

Gly Gly Ser Tyr Ile Ser Gly Ser Gln Ala Gln Gly Val Thr Ser Gly
 340 345 350

Gly Ser Gly Asn Cys Thr Ser Gly Gly Thr Thr Tyr His Gln Pro Ile
 355 360 365

Asn Pro Leu Leu Ser Ala Tyr Gly Leu Asp Leu Val Thr Gly
 370 375 380

<210> 11

<211> 378

<212> PRT

<213> Saccharomonospora xinjiangensis

<400> 11

5

ES 2 644 007 T3

Met Asn Arg Lys Asn Ala Ala Arg Leu Ile Ala Ser Val Thr Leu Ala
1 5 10 15

Ala Gly Thr Ala Val Ala Phe Thr Leu Pro Ala Thr Ala Ala Pro Ala
20 25 30

Ala Asp Ala Val Val Pro Ala Thr Ala Ala Asp Pro Val Val Gln Ala
35 40 45

ES 2 644 007 T3

Met Gln Arg Asp Leu Gly Leu Thr Lys Gln Glu Ala Glu Gln Arg Leu
50 55 60

Arg Ser Glu Ala Glu Ala Arg Glu Val His Glu Thr Val Ser Glu Arg
65 70 75 80

Leu Gly Ser Asp Phe Ala Gly Ala His Tyr Asp Ala Glu Arg Gly Thr
85 90 95

Leu Val Val Gly Val Thr Asp Ala Ala Glu Phe Ser Glu Val Arg Glu
100 105 110

Ala Gly Ala Thr Pro Arg Leu Val Glu His Thr Val Ala Asp Leu Glu
115 120 125

Ser Ala Ala Glu Lys Leu Asp Ala Lys Glu Ser Arg Ala Pro Glu Ser
130 135 140

Val Thr Gly Trp Tyr Val Asp Ile Glu Ala Asn Ser Val Val Val Thr
145 150 155 160

Thr Lys Pro Gly Thr Ala Gly Gln Ala Glu Arg Phe Val Ser Arg Ala
165 170 175

Gly Val Asp Ala Asp Ala Val Asp Val Val Glu Ser Lys Glu Ser Pro
180 185 190

Arg Ala Leu Met Asp Ile Ile Gly Gly Asn Ala Tyr Tyr Met Gly Ser
195 200 205

Gly Gly Arg Cys Ser Val Gly Phe Ser Val Gln Gly Gly Phe Val Thr
210 215 220

Ala Gly His Cys Gly Thr Thr Gly Thr Thr Thr Ser Ser Pro Thr Gly
225 230 235 240

Arg Phe Ala Gly Ser Ser Phe Pro Gly Asn Asp Tyr Ala Phe Val Arg
245 250 255

Thr Gly Ser Gly Asp Thr Leu Arg Pro Trp Val Asn Met Tyr Asn Gly
260 265 270

Ser Ala Arg Val Val Ser Gly Ser Ser Glu Ala Pro Val Gly Ser Ser
275 280 285

Ile Cys Arg Ser Gly Ser Thr Thr Gly Trp His Cys Gly Thr Val Glu
290 295 300

ES 2 644 007 T3

Ala Lys Asn Gln Thr Val Arg Tyr Pro Gln Gly Thr Val Tyr Gly Leu
305 310 315 320

Thr Arg Thr Asn Val Cys Ala Glu Pro Gly Asp Ser Gly Gly Ser Phe
325 330 335

Ile Ser Gly Asn Gln Ala Gln Gly Met Thr Ser Gly Gly Ser Gly Asn
340 345 350

Cys Thr Trp Gly Gly Thr Thr Tyr Phe Gln Pro Val Asn Glu Val Leu
355 360 365

Asn Ala Tyr Gly Leu Arg Leu Ile Thr Gly
370 375

<210> 12

<211> 379

5 <212> PRT

<213> Saccharomonospora cyanea

<400> 12

ES 2 644 007 T3

Met Asn Arg Lys Thr Ala Ala Arg Leu Ile Ala Ser Val Thr Leu Ala
 1 5 10 15

Ala Gly Thr Ala Met Ala Phe Thr Leu Pro Ala Thr Ala Ala Pro Ala
 20 25 30

Ala Pro Asp Ser Val Val Pro Thr Thr Glu Ala Asp Pro Val Val Lys
 35 40 45

Ala Met Gln Arg Asp Leu Gly Leu Thr Lys Glu Gln Ala Glu Gln Arg
 50 55 60

Leu Arg Ser Glu Ala Glu Ala Arg Lys Val His Glu Ala Val Thr Ala
 65 70 75 80

Asp Leu Gly Ala Asp Phe Ala Gly Ala His Tyr Asp Ala Ala Leu Gly
 85 90 95

Lys Leu Val Val Gly Val Thr Asp Ala Ala Glu Phe Asp Glu Val Arg
 100 105 110

Ala Ala Gly Ala Lys Pro Arg Leu Val Glu His Thr Val Ala Asp Leu
 115 120 125

Glu Gln Ala Ala Ala Ala Leu Asp Ala Lys Glu Asn Ser Ala Pro Glu
 130 135 140

ES 2 644 007 T3

Ser Val Thr Gly Trp Tyr Val Asp Val Glu Ala Asn Ser Val Val Val
 145 150 155 160

Thr Thr Ala Val Gly Thr Ala Glu Gln Ala Glu Arg Phe Val Asp Arg
 165 170 175

Ala Gly Val Asp Ala Asp Ala Val Ala Val Val Glu Ser Lys Glu Ser
 180 185 190

Pro Arg Ala Leu Met Asp Ile Ile Gly Gly Asn Ala Tyr Tyr Met Gly
 195 200 205

Ser Gly Gly Arg Cys Ser Ile Gly Phe Ala Val Gln Gly Gly Phe Val
 210 215 220

Thr Ala Gly His Cys Gly Thr Thr Gly Thr Ser Thr Ser Ser Pro Thr
 225 230 235 240

Gly Arg Phe Ala Gly Ser Ser Phe Pro Gly Asn Asp Tyr Ala Phe Val
 245 250 255

Gln Thr Gly Ser Gly Asp Thr Leu Arg Pro Trp Val Asn Met Tyr Asn
 260 265 270

Gly Ser Ala Arg Val Val Ser Gly Ser Ser Glu Ala Pro Val Gly Ser
 275 280 285

Ser Val Cys Arg Ser Gly Ser Thr Thr Gly Trp His Cys Gly Thr Ile
 290 295 300

Gln Ala Lys Asn Gln Thr Val Arg Tyr Ala Glu Gly Thr Val Tyr Gly
 305 310 315 320

Leu Thr Arg Thr Asn Val Cys Ala Glu Pro Gly Asp Ser Gly Gly Ser
 325 330 335

Phe Ile Ser Gly Asn Gln Ala Gln Gly Met Thr Ser Gly Gly Ser Gly
 340 345 350

Asn Cys Thr Trp Gly Gly Thr Thr Tyr Phe Gln Pro Val Asn Glu Val
 355 360 365

Leu Asn Ala Tyr Gly Leu Arg Leu Ile Thr Gly
 370 375

<210> 13

<211> 375

<212> PRT

5 <213> *Saccharomonospora paurometabolica*

<400> 13

ES 2 644 007 T3

Met Lys Arg Thr Arg Asn Gly Phe Ala Ala Arg Ala Gly Ala Ala Ala
 1 5 10 15

Val Leu Ala Ala Gly Thr Ala Ala Ala Phe Ala Leu Pro Ala Ser Ala
 20 25 30

Gln Pro Ala Pro Met Asp Val Asp Pro Gly Met Val Gln Ala Met Glu
 35 40 45

Arg Asp Leu Gly Leu Ser Gly Thr Gln Ala Glu Gln Arg Leu Arg Ser
 50 55 60

Glu Ala Thr Ala Arg Ala Val Asp Glu Thr Val Arg Ala Glu Leu Gly
 65 70 75 80

Asp Ser Phe Gly Gly Ser Phe Tyr Asp Ala Asp Lys Gly Gly Leu Val
 85 90 95

Val Ser Val Thr Asp Pro Ala Gln Leu Arg Glu Ala Arg Ala Ala Gly
 100 105 110

Ala Glu Ala Arg Met Val Asp Asp Ser Ala Ala Glu Leu Glu Ala Ala
 115 120 125

Ala Asn Arg Leu Asn Arg Ala Glu Ser Arg Ala Pro Gly Ser Val Thr
 130 135 140

Gly Trp Tyr Val Asp Val Glu Arg Asn Ser Val Val Val Thr Thr Thr
 145 150 155 160

Pro Gly Thr Ala Ala Gly Ala Glu Glu Phe Val Ala Ser Ala Gly Val
 165 170 175

Asp Ala Asp Thr Ala Glu Val Val Glu Ser Ala Glu Arg Pro Arg Ala
 180 185 190

Leu Met Asp Val Val Gly Gly Asn Ala Tyr Tyr Met Gly Ser Gly Gly
 195 200 205

Arg Cys Ser Val Gly Phe Ala Val Asn Gly Gly Phe Val Thr Ala Gly
 210 215 220

His Cys Gly Ser Thr Gly Glu Ser Thr Ser Gln Pro Ser Gly Thr Phe
 225 230 235 240

ES 2 644 007 T3

Ala Gly Ser Ser Phe Pro Tyr Asn Asp Tyr Ala Tyr Val Glu Thr Gly
 245 250 255

Ser Asp Asp Thr Pro Arg Pro Tyr Val Asn Thr Tyr Ser Gly Thr Arg
 260 265 270

Thr Val Ser Gly Ser Asn Glu Ala Pro Val Gly Ser Ser Ile Cys Arg
 275 280 285

Ser Gly Ser Thr Thr Gly Trp His Cys Gly Thr Val Glu Ala Lys Asn
 290 295 300

Gln Thr Val Arg Tyr Ser Gln Gly Ala Val Tyr Gly Met Thr Arg Thr
 305 310 315 320

Asp Val Cys Ala Glu Pro Gly Asp Ser Gly Gly Ser Phe Ile Ser Gly
 325 330 335

Asn Gln Ala Gln Gly Met Thr Ser Gly Gly Ser Gly Asn Cys Thr Trp
 340 345 350

Gly Gly Thr Thr Tyr Phe Gln Pro Val Asn Glu Ala Leu Asn Ala Tyr
 355 360 365

Gly Leu Ser Leu Val Thr Gly
 370 375

REIVINDICACIONES

1. Uso de un polipéptido aislado con actividad de proteasa, seleccionado del grupo que se compone de:
 5 (a) un polipéptido que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5;
 (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que se hibrida en condiciones de astringencia alta o condiciones astringencia muy alta con:
 (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 1;
 (ii) la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 3; y/o
 10 (iii) la cadena complementaria completa de (i) o (ii);
 (c) un polipéptido codificado por un polinucleótido que tiene al menos una identidad de secuencia del 90% con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 3;
 (d) una variante que comprende una sustitución, delección y/o inserción de uno o más aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, en donde el número de sustituciones, delecciones y/o inserciones de aminoácidos en SEQ ID NO: 5
 15 no es más de 19; y
 (e) un fragmento de un polipéptido de (a), (b), (c) o (d) con actividad de proteasa, en el que el fragmento comprende al menos 169 residuos de aminoácidos;
 en composiciones de piensos para animales y detergentes, en donde la proteasa tiene al menos el 80 % de la actividad proteasa de SEQ ID NO: 5.
 20
2. Uso de la reivindicación 1, en el que la concentración final de enzima en la dieta animal está dentro del intervalo de 0,01 a 200 mg de proteína enzimática por kg de dieta o en la que la concentración final de enzima en una composición detergente corresponde a 0,0005-100 mg de proteína enzimática por litro de líquido de lavado.
 25
3. Uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en las que el polipéptido comprende o se compone de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 y/o SEQ ID NO: 5.
4. Variante de polipéptido con actividad de proteasa y que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5 que comprende al menos una sustitución, delección y/o inserción de al menos uno o más aminoácidos de SEQ ID NO: 5, donde la proteasa tiene al menos un 80 % de la actividad de proteasa de SEQ ID NO: 5.
 30
5. Polinucleótido aislado que codifica el polipéptido indicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 con la condición de que no sea 100 % idéntico a SEQ ID NO: 1 o la parte codificante de polipéptido maduro de la misma.
 35
6. Constructo de ácidos nucleicos o vector de expresión que comprende el polinucleótido de la reivindicación 5 operativamente enlazado a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en una célula huésped de expresión.
 40
7. Célula huésped de expresión recombinante que comprende un polinucleótido de la reivindicación 5 operativamente enlazado a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido.
- 45 8. Célula huésped de la reivindicación 7, en la que el huésped es una bacteria, tal como un *Bacillus*; un hongo, tal como un *Aspergillus*; o una levadura, tal como *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Yarrowia*.
9. Método para producir el polipéptido indicado en la reivindicación 4, que comprende:
 50 (a) cultivar una célula que, en su forma de tipo salvaje, produce el polipéptido, en condiciones propicias para la producción del polipéptido; y
 (b) recuperar el polipéptido.
10. Método para producir el polipéptido indicado en la reivindicación 4, que comprende:
 55 (a) cultivar una célula huésped de la reivindicación 7 en condiciones propicias para la producción del polipéptido; y
 (b) recuperar el polipéptido.
11. Uso de al menos un polipéptido indicado en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4:
 60 en piensos para animales;
 en aditivos para piensos;
 en la preparación de una composición para usar en piensos para animales;
 para mejorar el valor nutricional de un pienso para animales;
 para aumentar la proteína digerible y/o soluble en piensos para animales; y/o
 65 para aumentar el grado de hidrólisis de proteínas en dietas de animales.

12. Método para mejorar el valor nutricional de un pienso para animales, en el que al menos un polipéptido indicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 se añade al pienso.
- 5 13. Aditivo de piensos para animales que comprende:
al menos un polipéptido indicado en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4; y
al menos una vitamina liposoluble, y/o
al menos una vitamina hidrosoluble, y/o
al menos un oligoelemento.
- 10 14. Aditivo de pienso para animales de la reivindicación 13, que comprende además una o más amilasas; fitasas; xilanasas; galactanasas; alfa-galactosidasas; proteasas, fosfolipasas, beta-glucanasas o cualquier mezcla de las mismas.
- 15 15. Pienso para animales que comprende un aditivo de piensos para animales de la reivindicación 13 o 14 que tiene un contenido bruto de proteína de 50 a 800 g/kg.
16. Pienso para animales de la reivindicación 15 que está en forma de gránulos.
- 20 17. Granulado o microgranulado que comprende al menos un polipéptido indicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 25 18. Composición detergente que comprende al menos un polipéptido indicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y uno o más componentes seleccionados del grupo que comprende surfactantes, constructores, hidrótrofos, sistemas blanqueadores, polímeros, agentes matizadores de tejidos, materiales adjuntos, dispersantes, agentes inhibidores de transferencia de colorantes, agentes blanqueadores fluorescentes, polímeros antimanchas y agentes antirredeposición.
- 30 19. Composición detergente de la reivindicación 18, en la que la composición comprende una o más enzimas seleccionadas del grupo que comprende proteasas, amilasas, lipasas, cutinasas, celulasas, endoglucanasas, xiloglucanasas, pectinasas, pectín liasas, xantaninas, peroxidinas, haloperoxigeninas, catalinas y mananasas o cualquier mezcla de las mismas.

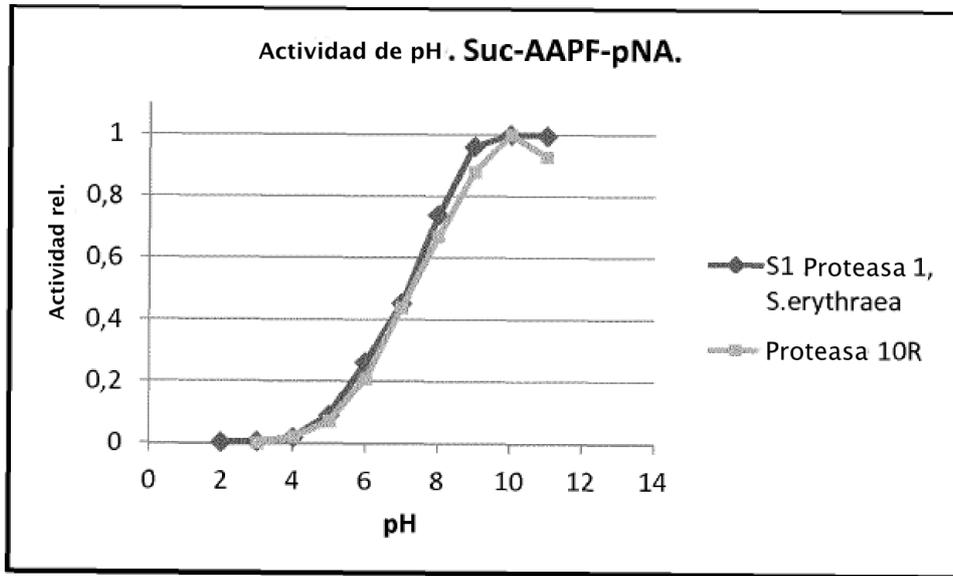


Fig. 1

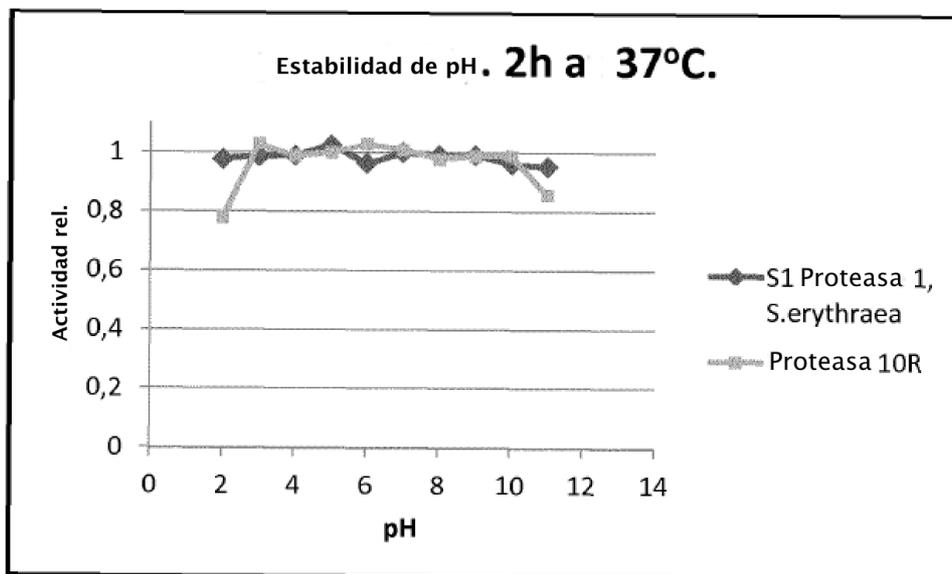


Fig. 2.

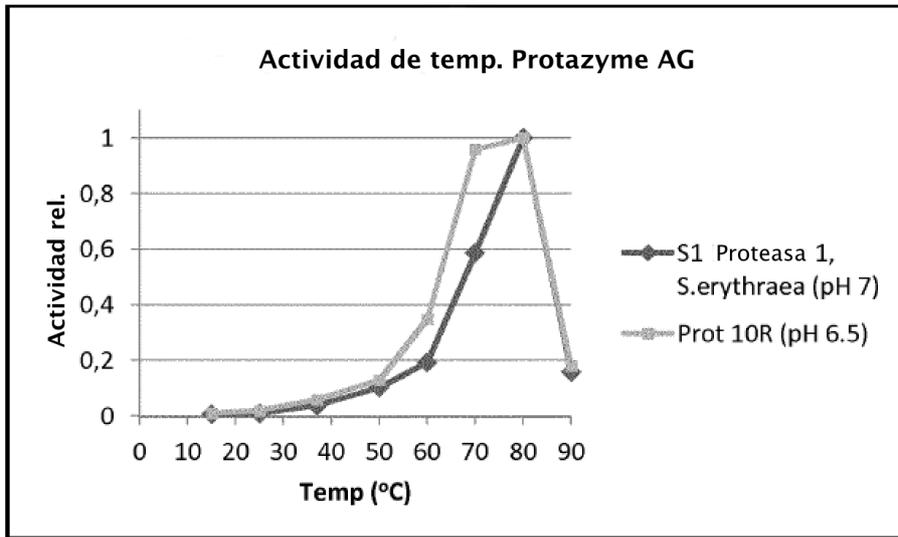


Fig. 3.

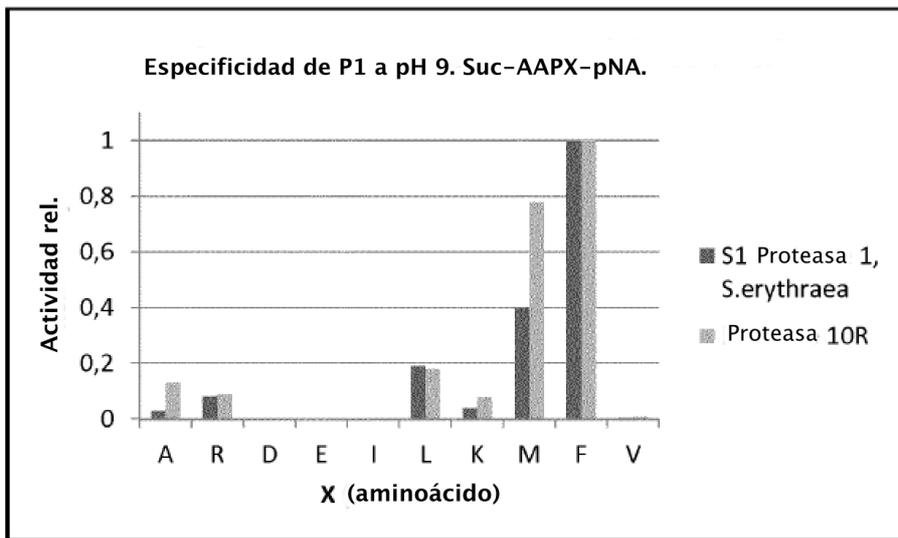


Fig. 4.

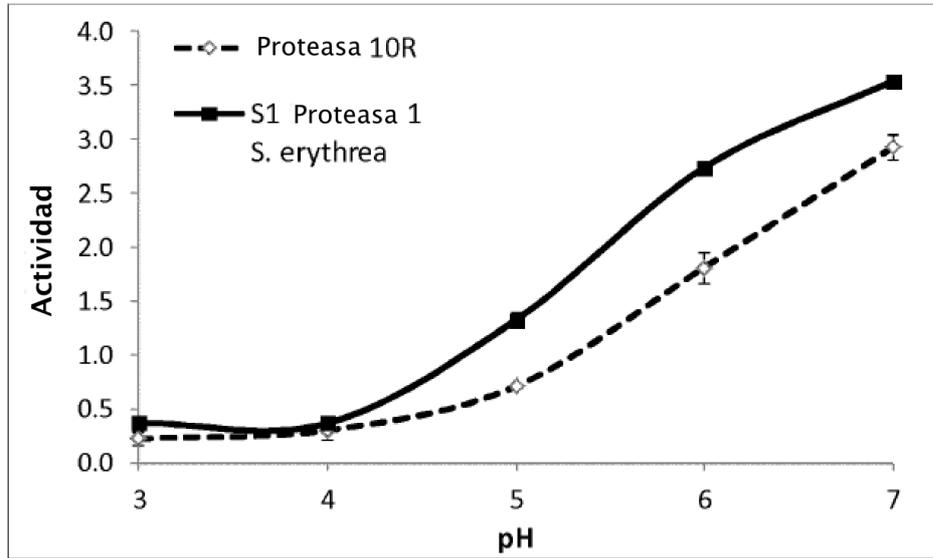


Fig. 5.