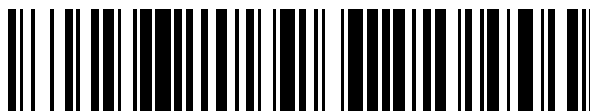


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 694 765**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/58**

(2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.09.2013 PCT/EP2013/068361**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.03.2014 WO14037438**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2013 E 13758862 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018 EP 2893012**

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

30 Prioridad:

**05.09.2012 EP 12183079**

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

**27.12.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**STRINGER, MARY, ANN;  
HOFF, TINE;  
OESTERGAARD, PETER, RAHBEK y  
PONTOPPIDAN, FRUERGAARD, KATRINE**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 694 765 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Polipéptidos con actividad de proteasa

## Referencia a un listado de secuencias

- 5 [0001] Esta solicitud contiene un listado de secuencias en formato legible por ordenador, que se incorpora en la presente para referencia.

## Antecedentes de la invención

## Campo de la invención

- 10 [0002] La presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen actividad de proteasa y secuencias de ácidos nucleicos aisladas que codifican las proteasas. La invención también se refiere a constructos de ácidos nucleicos, vectores y células huésped, incluyendo células vegetales y animales, que comprenden las secuencias de ácidos nucleicos, así como métodos para producir y utilizar las proteasas, en particular el uso de las proteasas en piensos para animales.

## Antecedentes de la invención

- 15 [0003] Cabe señalar que, en el uso de proteasas en piensos para animales (*in vivo*) y/o el uso de tales proteasas para tratar proteínas vegetales (*in vitro*), las proteínas son factores nutricionales esenciales para animales y seres humanos. Los seres humanos y el ganado normalmente obtienen las proteínas necesarias de fuentes de proteína vegetales. Son fuentes de proteína vegetales importantes, por ejemplo, los cultivos de semillas oleaginosas, las legumbres y los cereales.

- 20 [0004] Cuando, por ejemplo, se incluye harina de soja en el pienso para animales monogástricos tales como cerdos y aves, una proporción significativa de la harina de soja no se digiere de manera eficaz (la digestibilidad ileal aparente de proteínas en lechones, cerdos en crecimiento y aves tales como pollos de engorde, gallinas ponedoras y gallos es solo de alrededor de un 80%).

- 25 [0005] El pedtubo digestivo de los animales consiste en una serie de segmentos, cada uno representando diferentes ambientes de pH. En animales monogástricos tales como cerdos y aves y muchos tipos de pescado, el estómago es marcadamente ácido con un pH potencialmente tan bajo como 1-2, mientras que el intestino tiene un pH más neutro de alrededor de 6-7,5. Aparte del estómago y el intestino, las aves también tienen un buche que precede al estómago. El pH en el buche está determinado principalmente por el pienso ingerido y por lo tanto típicamente se sitúa en el intervalo de pH 4-6. La digestión de proteínas por una proteasa puede ocurrir a lo largo de todo el tracto digestivo, siempre que la proteasa se active y sobreviva a las condiciones del tracto digestivo. Por lo tanto, las proteasas que son altamente estables en ácido y pueden sobrevivir así en el ambiente gástrico y al mismo tiempo son eficazmente activas en el amplio intervalo de pH fisiológico del tracto digestivo en el animal diana son especialmente deseables. Las novedosas proteasas S53 de la invención son útiles para estos fines.

- 35 [0006] Ya que el pienso para animales se formula frecuentemente en forma granulada, en el cual se aplica vapor en el proceso de granulación, es deseable también que las proteasas usadas en piensos para animales sean capaces de permanecer activas después de la exposición a dicho tratamiento de vapor.

[0007] Para producir una proteasa para el uso industrial, es importante que la proteasa se produzca en rendimientos altos que hacen que el producto esté disponible en cantidades suficientes para ser capaz de proporcionar la proteasa a un precio favorable.

## 40 Descripción de la técnica relacionada

- 45 [0008] Las proteasas S53 se conocen en la técnica. Un péptido S53 de *Grifola frondosa* con número de registro MER078639 (SEQ ID N.º: 9) tiene un 83,6% de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 5. Martínez et al. aislaron una proteasa S53 de *Postia placenta* (Uniprot: B8PMI5, SEQ ID N.º: 10) con un 74,5% de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 5 en "Genome, transcriptome, and secretome analysis of wood decay fungus *Postia placenta* supports unique mechanisms of lignocellulose conversion", 2009, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106:1954-1959.

[0009] VandenWymelenberg et al. han aislado una proteasa S53 (Uniprot: Q281W2, SEQ ID N.º: 11) en "Computational analysis of the Phanerochaete chrysosporium v2.0 genome database and mass spectrometry identification of peptides in ligninolytic cultures reveal complex mixtures of secreted proteins", 2006, Fungal Genet. Biol. 43:343-356 con un 74,1% de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 5. Otro polipéptido S53 de *Postia placenta* (Uniprot:B8P431, SEQ ID N.º: 12) ha sido identificado por Martinez et al. en "Genome, transcriptome, and secretome analysis of wood decay fungus *Postia placenta* supports unique mechanisms of lignocellulose conversion", 2009, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106:1954-1959 con un 68,2% de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 5. Otros péptidos, incluyendo proteasas S53, tienen menos de un 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 5.

[0010] Floudas et al. han publicado la secuencia de una proteasa S53 en "The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes", 2012, Science, 336:1715-1719 con un 80,6% de identidad con la SEQ ID N.º: 5. Fernandez-Fueyo et al. han publicado las secuencias de tres serinproteasas en "Comparative genomics of *Ceriporiopsis subvermispora* and *Phanerochaete chrysosporium* provide insight into selective ligninolysis", 2012, Proc Natl Acad Sci USA. 109:5458-5463 (Uniprot:M2QQ01, SEQ ID N.º: 26, Uniprot:M2QWH2, SEQ ID N.º: 27; Uniprot:M2RD67, SEQ ID N.º: 28) con un 80,8%, 79,1% y 78,6% de identidad respectivamente con la SEQ ID N.º: 5.

[0011] WO 02/068623 describe una proteasa de *Aspergillus niger* con un 49,2% de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 5 para el uso en aplicaciones en piensos y alimentación. WO 12/048334 describe endopeptidasas de tipo serina de *Myceliophthora thermophila* como un aditivo para piensos o para piensos con un 47,9% de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 5.

[0012] WO 95/28850 divulga la combinación de una fitasa y una o más enzimas proteolíticas microbianas para mejorar la solubilidad de proteínas vegetales. WO 01/58275 divulga el uso de proteasas estables en ácido de la familia de la subtilisina en piensos para animales. WO 01/58276 divulga el uso de proteasas estables en ácido derivadas de *Nocardiopsis sp.* NRRL 18262 (la proteasa 10R), así como una proteasa derivada de *Nocardiopsis alba* DSM 14010 en piensos para animales. WO 04/072221, WO 04/111220, WO 04/111223, WO 05/035747 y WO 05/123911 revelan proteasas relacionadas con la proteasa 10R y su uso en piensos para animales. WO 04/072279 divulga el uso de otras proteasas en piensos para animales. WO 04/034776 divulga el uso de una subtilisina/queratinasa, PWD-1 de *B. Licheniformis*, en el pienso para aves. WO 04/077960 divulga un método para aumentar la digestibilidad de forraje o grano en rumiantes aplicando una proteasa bacteriana o fúngica.

[0013] Los productos comerciales que comprenden una proteasa y comercializados para el uso en piensos para animales incluyen RONOZYME® ProAct (DSM NP/Novozymes), Axtra® (Danisco), Avizyme® (Danisco), Porzyme® (Danisco), Allzyme™ (Alltech), Versazyme® (BioResources, Int.), Poultrygrow™ (Jefo) y Cibenza® DP100 (Novus).

## Resumen de la invención

[0014] La presente invención relacionada con un polipéptido aislado que tiene actividad de proteasa, seleccionado del grupo constituido por:

- (a) un polipéptido que tiene al menos un 84% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5;
- (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que tiene al menos un 84% de identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 1;
- (c) una variante del polipéptido de SEQ ID N.º: 5 que comprende una sustitución, delección y/o inserción en una o más posiciones, donde el número total de sustituciones, delecciones y/o inserciones de aminoácidos no es superior a 20; y
- (d) un fragmento de un polipéptido de (a), (b) o (c) con actividad de proteasa,

en el que el polipéptido tiene una actividad de proteasa mejorada a un pH de entre 3 y 4, a 25°C en comparación con la proteasa NRRL 18262. La invención se dirige además al polipéptido anteriormente definido que comprende o consiste en la SEQ ID N.º: 2, SEQ ID N.º: 4, SEQ ID N.º: 5 o SEQ ID N.º: 6 y a un polinucleótido aislado que codifica los polipéptidos de la invención.

[0015] La invención se refiere además a polinucleótidos aislados que codifican los polipéptidos de la presente invención, constructos de ácido nucleico, vectores de expresión recombinantes y a métodos para producir los polipéptidos.

[0016] La presente invención se refiere a una célula huésped de expresión recombinante que comprende el polinucleótido de la invención unido operativamente a una o más secuencias de control que dirigen la producción

del polipéptido donde el huésped se selecciona del grupo consistente en *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* y *Trichoderma* o donde el huésped es una levadura, tal como *Pichia* o *Saccharomyces*, o un *Bacillus* tal como *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* o *Bacillus thuringiensis*.

[0017] Además, la invención se dirige a un método para mejorar el valor nutricional de un pienso para animales, donde al menos un polipéptido de la invención se añade al pienso así como a un aditivo para piensos para animales que comprende al menos un polipéptido de la invención; y al menos una vitamina liposoluble, y/o al menos una vitamina hidrosoluble, y/o al menos un oligoelemento.

[0018] La presente invención también se refiere a composiciones, preferiblemente composiciones de piensos para animales, que comprenden los polipéptidos de la invención; uso de los polipéptidos de la invención en piensos para animales o como aditivos para piensos para animales; métodos para preparar una composición para el uso en piensos para animales, para mejorar el valor nutricional de un pienso para animales, y métodos de tratamiento de proteínas a utilizar en composiciones de piensos para animales.

#### Resumen del listado de secuencias

[0019]

SEQ ID N.º: 1 es la secuencia de ADNc de la proteasa S53 3 tal como se aísla de *Meripilus giganteus*.  
 SEQ ID N.º: 2 es la secuencia de aminoácidos tal como se desprende de la SEQ ID N.º: 1.  
 SEQ ID N.º: 3 es la secuencia de ADN de la secuencia de ADN de expresión recombinante de la SEQ ID N.º: 1 con etiqueta HQ.  
 SEQ ID N.º: 4 es la secuencia de aminoácidos tal como se desprende de la SEQ ID N.º: 3.  
 SEQ ID N.º: 5 es la secuencia de aminoácidos de la proteasa S53 3 madura de *Meripilus giganteus*.  
 SEQ ID N.º: 6 es la secuencia de aminoácidos de la proteasa S53 madura obtenida de la SEQ ID N.º: 3.  
 SEQ ID N.º: 7 es la secuencia de ADN de la proteasa 10R (WO 05/035747, SEQ ID N.º: 1).  
 SEQ ID N.º: 8 es la secuencia de aminoácidos de la proteasa 10R (WO 05/035747, SEQ ID N.º: 2).  
 SEQ ID N.º: 9 es la secuencia de aminoácidos de un péptido S53 de *Grifola frondosa* (MER078639).  
 SEQ ID N.º: 10 es la secuencia de aminoácidos de un péptido S53 de *Postia placenta* (Uniprot: B8PMI5).  
 SEQ ID N.º: 11 es la secuencia de aminoácidos de un péptido S53 de *Phanerochaete chrysosporium* (Uniprot: Q281W2).  
 SEQ ID N.º: 12 es la secuencia de aminoácidos de un péptido S53 de *Postia placenta* (Uniprot: B8P431).  
 SEQ ID N.º: 13 es el cebador 597.  
 SEQ ID N.º: 14 es el cebador 598.  
 SEQ ID N.º: 15 es la secuencia de ADNc de la proteasa S53 1 aislada de *Trametes cf. versicolor*.  
 SEQ ID N.º: 16 es la secuencia de aminoácidos tal como se deduce de la SEQ ID N.º: 15.  
 SEQ ID N.º: 17 es la secuencia de ADN de la secuencia de ADN recombinante expresada a partir de la SEQ ID N.º: 15.  
 SEQ ID N.º: 18 es la secuencia de aminoácidos tal como se desprende de la SEQ ID N.º: 17.  
 SEQ ID N.º: 19 es la secuencia de aminoácidos de la proteasa S53 madura obtenida de la SEQ ID N.º: 15 y la SEQ ID N.º: 17.  
 SEQ ID N.º: 20 es la secuencia de ADNc de la proteasa S53 2 aislada de *Trametes versicolor*.  
 SEQ ID N.º: 21 es la secuencia de aminoácidos tal como se deduce de la SEQ ID N.º: 20.  
 SEQ ID N.º: 22 es la secuencia de ADN de la secuencia de ADN recombinante expresada a partir de la SEQ ID N.º: 20.  
 SEQ ID N.º: 23 es la secuencia de aminoácidos tal como se desprende de la SEQ ID N.º: 22.  
 SEQ ID N.º: 24 es la secuencia de aminoácidos de la proteasa S53 madura obtenida de la SEQ ID N.º: 20 y la SEQ ID N.º: 22.  
 SEQ ID N.º: 25 es la secuencia de aminoácidos de un péptido S53 de *Dichomitus squalens* (Uniprot: R7SPH9).  
 SEQ ID N.º: 26 es la secuencia de aminoácidos de un péptido S53 de *Ceriporiopsis subvermispora* (Uniprot: M2QQ01).  
 SEQ ID N.º: 27 es la secuencia de aminoácidos de un péptido S53 de *Ceriporiopsis subvermispora* (Uniprot: M2QWH2).  
 SEQ ID N.º: 27 es la secuencia de aminoácidos de un péptido S53 de *Ceriporiopsis subvermispora* (Uniprot: M2QWH2).

SEQ ID N.º: 28 es la secuencia de aminoácidos de un péptido S53 de *Ceriporiopsis subvermispora* (Uniprot: M2RD67).

**Matriz de identidad de secuencias:**

	SEQ ID:2	SEQ ID:5	SEQ ID:9	SEQ ID:18	SEQ ID:19	SEQ ID:23	SEQ ID:24	SEQ ID:25	SEQ ID:26	SEQ ID:27	SEQ ID:28
SEQ ID:2	100	100	79,8	86,7	86,6	86,0	85,5	76,2	75,0	73,1	72,8
SEQ ID:5	100	100	83,6	86,6	86,6	85,5	85,5	80,6	80,8	79,1	78,6
SEQ ID:9	79,8	83,6	100	79,6	84,1	78,6	82,7	72,7	78,0	75,8	76,4
SEQ ID:18	86,7	86,6	79,6	100	100	96,5	96,2	77,8	77,0	75,0	74,8
SEQ ID:19	86,6	86,6	84,1	100	100	96,2	96,2	81,4	82,5	79,4	79,7
SEQ ID:23	86,0	85,5	78,6	96,5	96,2	100	100	76,8	77,1	75,0	74,7
SEQ ID:24	85,5	85,5	82,7	96,2	96,2	100	100	80,0	82,2	79,1	79,5
SEQ ID:25	76,2	80,6	72,7	77,8	81,4	76,8	80,0	100	70,4	68,9	69,4
SEQ ID:26	75,0	80,8	78,0	77,0	82,5	77,1	82,2	70,4	100	93,0	94,2
SEQ ID:27	73,1	79,1	75,8	75,0	79,4	75,0	79,1	68,9	93,0	100	94,4
SEQ ID:28	72,8	78,6	76,4	74,8	79,7	74,7	79,5	69,4	94,2	94,4	100

**Breve descripción de las figuras**

5 [0020]

La figura 1 muestra el perfil de actividad en función del pH de la proteasa S53 3 de *Meripilus giganteus* (del ejemplo 2) en comparación con la proteasa 10R en el sustrato Suc-AAPF-pNA a 25°C.

La figura 2 muestra el perfil de estabilidad en función del pH de la proteasa S53 3 de *Meripilus giganteus* (del ejemplo 2) en comparación con la proteasa 10R (actividad residual tras 2 horas a 37°C).

10 La figura 3 muestra el perfil de actividad en función de la temperatura de la proteasa S53 3 de *Meripilus giganteus* (del ejemplo 2) a pH 4,0 en comparación con la proteasa 10R en Protazyme AK a pH 6,5.

La figura 4 muestra la especificidad por P1 de la proteasa S53 3 de *Meripilus giganteus* (del ejemplo 2) a pH 4 en comparación con la proteasa 10R a pH 9,0 en 10 sustratos Suc-AAPX-pNA a 25°C.

15 La figura 5 muestra la actividad (OD340 x factor de dilución) en harina de maíz y soja de la proteasa S53 3 de *Meripilus giganteus* (del ejemplo 2) en comparación con la proteasa 10R.

La figura 6 muestra el nivel de aminas libres (OD340 x factor de dilución) en muestras blanco T<sub>0</sub>, muestras blanco y muestras incubadas con la proteasa S53 3 de *Meripilus giganteus* (del ejemplo 2) o la proteasa 10R.

20 La figura 7 muestra el perfil de actividad en función del pH de la proteasa S53 1 aislada de *Trametes cf. versicolor* en comparación con la proteasa S53 3 de *Meripilus giganteus* (del ejemplo 2) en el sustrato Suc-AAPF-pNA a 25°C.

La figura 8 muestra el perfil de estabilidad en función del pH de la proteasa S53 1 aislada de *Trametes cf. versicolor* en comparación con la Proteasa S53 3 de *Meripilus giganteus* (del ejemplo 2) (actividad residual tras 2 horas a 37°C).

La figura 9 muestra el perfil de actividad en función de la temperatura de la proteasa S53 1 aislada de *Trametes cf. versicolor* en comparación con la proteasa S53 3 de *Meripilus giganteus* (del ejemplo 2) en Protazyme AK a pH 4.

La figura 10 muestra la especificidad por P1 de la proteasa S53 1 aislada de *Trametes cf. versicolor* en comparación con la proteasa S53 3 de *Meripilus giganteus* (del ejemplo 2) a pH 4 en 10 sustratos Suc-AAPX-PNA, a 25°C.

## Definiciones

[0021] **Variante alélica:** el término "variante alélica" se refiere a cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupan el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge naturalmente a través de mutaciones y puede resultar en polimorfismos dentro de poblaciones. Las mutaciones de gen pueden ser silenciosas (sin cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos alteradas. Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

[0022] **ADNc:** el término "ADNc" se refiere a una molécula de ADN que se puede preparar por transcripción inversa a partir de una molécula de ARNm madura y empalmada, obtenida de una célula eucariota. El ADNc carece de secuencias de intrones que pueden estar presentes en el ADN genómico correspondiente. El transcrito de ARN primario inicial 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.

[0023] **Secuencia codificante:** el término "secuencia codificante" se refiere a 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 empieza normalmente con el codón de inicio ATG o codones de inicio alternativos tales como GTG y TTG y termina con un codón de parada tal como, TAA, TAG y TGA. La secuencia codificante puede ser un polinucleótido de ADN, ADNc, sintético o recombinante.

[0024] **Secuencias de control:** el término "secuencias de control" se refiere a secuencias de ácido nucleico necesarias para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido maduro de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa (es decir, del mismo gen) o exógena (es decir, de un gen diferente) al polinucleótido que codifica el polipéptido o nativa o exógenas entre sí. Tales secuencias de control incluyen, pero de forma no limitativa, un líder, secuencia de poliadenilación, secuencia de propéptido, promotor, secuencia de péptido señal y terminador de la transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor y señales de terminación transcripcional y traduccional. Las secuencias de control pueden estar provistas de conectores con el propósito de introducir sitios de restricción específicos que faciliten el ligamiento de las secuencias de control con la región codificante del polinucleótido que codifica una variante.

[0025] **Expresión:** el término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción del polipéptido incluyendo, pero de forma no limitativa, la transcripción, la modificación postranscripcional, la traducción, la modificación postraduccional y la secreción.

[0026] **Vector de expresión:** el término "vector de expresión" se refiere a una molécula de ADN lineal o circular que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido y está unido operativamente a nucleótidos adicionales que proveen a su expresión.

[0027] **Fragmento:** el término "fragmento" se refiere a un polipéptido con uno o más (por ejemplo, varios) aminoácidos eliminados del extremo amino y/o carboxilo terminal de un polipéptido maduro; donde el fragmento tiene actividad de proteasa. En un aspecto, un fragmento contiene al menos 330 residuos aminoacídicos (por ejemplo, aminoácidos 20 a 349 de la SEQ ID N.º: 2 o la SEQ ID N.º: 5); en otro aspecto, un fragmento contiene al menos 345 residuos aminoacídicos (por ejemplo, los aminoácidos 10 a 354 de la SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 5); en un aspecto adicional, un fragmento contiene al menos 355 residuos aminoacídicos (por ejemplo, los aminoácidos 5 a 359 de la SEQ ID N.º: 2 o la SEQ ID N.º: 5). En un aspecto, un fragmento contiene al menos 330 residuos aminoacídicos (por ejemplo, los aminoácidos 20 a 349 de la SEQ ID N.º: 16 o la SEQ ID N.º: 20); en otro aspecto, un fragmento contiene al menos 345 residuos aminoacídicos (por ejemplo, los aminoácidos 10 a 354 de la SEQ ID N.º: 16 o la SEQ ID N.º: 20); en un aspecto adicional, un fragmento contiene al menos 355 residuos aminoacídicos (por ejemplo, los aminoácidos 5 a 359 de la SEQ ID N.º: 16 o la SEQ ID N.º: 20). En un aspecto, un fragmento contiene al menos 330 residuos aminoacídicos (por ejemplo, los aminoácidos 20 a 349 de la SEQ ID N.º: 21 o la SEQ ID N.º: 24); en otro aspecto, un fragmento contiene al menos 345 residuos aminoacídicos (por ejemplo, los aminoácidos 10 a 354 de la SEQ ID N.º: 21 o la SEQ ID N.º: 24); en un aspecto adicional, un fragmento contiene al menos 355 residuos aminoacídicos (por ejemplo, los aminoácidos 5 a 359 de la SEQ ID N.º: 21 o la SEQ ID N.º: 24).

[0028] **Célula huésped:** el término "célula huésped" se refiere a cualquier tipo celular que es susceptible de transformación, transfección, transducción y similar con un constructo de ácido nucleico o vector de expresión que comprende un polinucleótido de la presente invención. El término "célula huésped" abarca cualquier progenie de una célula parental que no es idéntica a la célula parental debido a mutaciones que ocurren durante la replicación.

[0029] **Polinucleótido aislado:** el término "polinucleótido aislado" se refiere a un polinucleótido que está en una forma o ambiente que no ocurre en la naturaleza, tal como (1) cualquier polinucleótido que no ocurra de forma natural, (2) cualquier polinucleótido que esté al menos parcialmente apartado de uno o más o todos los constituyentes de origen natural con los que está asociado en la naturaleza; (3) cualquier polinucleótido que esté modificado por la mano del hombre con respecto a ese polinucleótido tal como se encuentra en la naturaleza o (4) cualquier polinucleótido modificado mediante el aumento de la cantidad del polinucleótido con respecto a otros componentes con los que está asociado naturalmente (por ejemplo, producción recombinante en una célula huésped; copias múltiples de un gen codificante de la sustancia; y uso de un promotor más fuerte que el promotor naturalmente asociado al gen codificante de la sustancia). En un aspecto, el polinucleótido aislado es al menos un 1% puro, por ejemplo, al menos un 5% puro, más 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, como se determina por electroforesis de agarosa. Los polinucleótidos pueden ser de origen genómico, de ADNc, de ARN, semisintético, sintético o cualquier combinación de los mismos.

[0030] **Polipéptido aislado:** el término "polipéptido aislado" se refiere a un polipéptido que está en una forma o ambiente que no ocurre en la naturaleza, tal como (1) cualquier polipéptido que no ocurra de forma natural, (2) cualquier polipéptido que esté al menos parcialmente apartado de uno o más o todos los constituyentes de origen natural con los que está asociado en la naturaleza; (3) cualquier polipéptido que esté modificado por la mano del hombre con respecto a ese polipéptido tal como se encuentra en la naturaleza mezclado con otros componentes, tales como otros polipéptidos, metabolitos secundarios, sales y otros o (4) cualquier polipéptido modificado mediante el aumento de la cantidad del polipéptido con respecto a otros componentes con los que está asociado naturalmente. En un aspecto, el polipéptido es al menos un 1% puro, por ejemplo, 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 como se determina por SDS-PAGE.

[0031] **Polipéptido maduro:** el término "polipéptido maduro" se refiere a un polipéptido en su forma final tras la traducción y cualquier modificación postraduccional, tal como procesado del extremo N-terminal, truncamiento del extremo C-terminal, glicosilación, fosforilación, etc. En un aspecto, el polipéptido maduro está constituido por los aminoácidos 1 a 366 en la numeración de la SEQ ID N.º: 2 basada en la secuenciación que usa la degradación de Edman y el análisis de peso molecular intacto del polipéptido maduro con etiqueta HQ C-terminal. Utilizando el programa de predicción SignalP (Nielsen et al., 1997, Protein Engineering 10: 1-6), se predice que los aminoácidos -198 a -182 en la numeración de la SEQ ID N.º: 2 constituyen el péptido señal.

[0032] En otro aspecto, el polipéptido maduro está constituido por los aminoácidos 1 a 366 en la numeración de la SEQ ID N.º: 17 basada en la secuenciación que usa la degradación de Edman y el análisis de peso molecular intacto del polipéptido maduro. Utilizando el programa de predicción SignalP (Nielsen et al., 1997, Protein Engineering 10: 1-6), se predice que los aminoácidos -199 a -183 en la numeración de la SEQ ID N.º: 17 constituyen el péptido señal.

[0033] En otro aspecto, el polipéptido maduro en la numeración de la SEQ ID N.º: 23 se predice que está constituido por los aminoácidos 1 a 366 y el péptido de señal se predice que está constituido por los aminoácidos -199 a -183 basado en el programa de predicción SignalP (Nielsen et al., 1997, Protein Engineering 10: 1-6). Se conoce 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.

[0034] **Secuencia codificante del polipéptido maduro:** el término "secuencia codificante del polipéptido maduro" se refiere a un polinucleótido que codifica un polipéptido maduro con actividad de proteasa. En un aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro está constituido por los nucleótidos 605 a 1702 en la numeración de la SEQ ID N.º: 1 basada en la determinación del polipéptido maduro por degradación de Edman y análisis de peso molecular intacto del polipéptido maduro con etiqueta HQ C-terminal. Además se predice que los nucleótidos 11 a 61 en la numeración de la SEQ ID N.º: 1 codifican un péptido señal basado en el programa de predicción SignalP (Nielsen et al., 1997, Protein Engineering 10: 1-6).

[0035] En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es la secuencia unida de los nucleótidos 707 a 853, los nucleótidos 912 a 1022, los nucleótidos 1077 a 1276, los nucleótidos 1332 a 1469, los nucleótidos 1531 a 1978 y los nucleótidos 2031 a 2084 de la SEQ ID N.º: 15 o la secuencia de ADNc de los mismos basada

en la determinación del polipéptido maduro por degradación de Edman y análisis de peso molecular intacto del polipéptido maduro. Se predice que los nucleótidos 1 a 51 en la numeración de la SEQ ID N.º: 15 codifican un péptido señal basado en el programa de predicción SignalP (Nielsen et al., 1997, Protein Engineering 10: 1-6). En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro está constituido por los nucleótidos 598 a 1695 de la SEQ ID N.º: 17 o la secuencia de ADNc de la misma basada en la determinación del polipéptido maduro por degradación de Edman y análisis de peso molecular intacto del polipéptido maduro. Se predice que los nucleótidos 1 a 51 en la numeración de la SEQ ID N.º: 22 codifican un péptido señal basado en el programa de predicción SignalP (Nielsen et al., 1997, Protein Engineering 10: 1-6).

[0036] En otro aspecto, se predice que la secuencia codificante del polipéptido maduro constituye la secuencia unida de los nucleótidos 706 a 852, los nucleótidos 914 a 1024, los nucleótidos 1080 a 1279, los nucleótidos 1333 a 1470, los nucleótidos 1532 a 1979 y los nucleótidos 2032 a 2085 de la SEQ ID N.º: 20 o la secuencia de ADNc de los mismos basada en el programa SignalP (Nielsen et al., 1997, supra) que predice que los nucleótidos 1 a 51 de la SEQ ID N.º: 20 codifican un péptido señal. En otro aspecto, se predice que la secuencia codificante del polipéptido maduro está constituida por los nucleótidos 598 a 1695 de la SEQ ID N.º: 22 o la secuencia de ADNc de la misma basada en el programa SignalP (Nielsen et al., 1997, supra) que predice que los nucleótidos 1 a 51 de la SEQ ID N.º: 22 codifican un péptido señal.

[0037] **Construido de ácido nucleico:** el término "construido de ácido nucleico" se refiere a una molécula de ácido nucleico, ya sea mono- o bicatenario, que se aísla de un gen de origen natural o se modifica para contener segmentos de ácidos nucleicos de manera que de otro modo no existiría en la naturaleza o que es sintético. El término construido de ácido nucleico es sinónimo del término "casete de expresión" cuando el construido de ácido nucleico contiene las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia codificante de la presente invención.

[0038] **Unido operativamente:** el término "unido operativamente" se refiere a una configuración en la que una secuencia de control se coloca en una posición apropiada con relación a la secuencia codificante de un polinucleótido tal que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia codificante.

[0039] Actividad de proteasa: el término "actividad de proteasa" se refiere a actividad proteolítica (EC 3.4). Hay diferentes tipos de actividad de proteasa tales como proteasas de tipo tripsina que escinde el lado carboxiterminal de los residuos de Arg y Lys y proteasas de tipo quimotripsina escinden el lado carboxiterminal de residuos aminoácidos hidrofóbicos. Las proteasas de la invención son endopeptidasas serinicas (EC 3.4.21) con un pH óptimo ácido (pH óptimo < pH 7).

[0040] La actividad de proteasa se puede medir utilizando 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 ensayo de temperatura se adaptan igualmente a la proteasa en cuestión. Ejemplos de valores de pH de ensayo son pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12. Ejemplos de temperaturas de ensayo son 15, 20, 25, 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 90 o 95°C. Ejemplos de sustratos de proteasa generales 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 de ensayo con la proteasa en cuestión, la cantidad de hemoglobina soluble en ácido tricloroacético se determina como una medición 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).

[0041] Para el propósito de la presente invención, la actividad de proteasa se determinó utilizando ensayos que se describen en "Materiales y métodos", tales como el ensayo cinético Suc-AAPF-pNA, ensayo Protazyme AK, ensayo cinético Suc-AAPX-pNA y o-ftaldialdehído (OPA). En el ensayo Protazyme AK, el sustrato insoluble Protazyme AK (caseína entrecruzada con azurina) libera un color azul cuando se incuba con la proteasa y el color se determina como una medición de la actividad de proteasa. En el ensayo Suc-AAPF-pNA, el sustrato incoloro Suc-AAPF-pNA libera paranitroanilina amarilla cuando se incuba con la proteasa y el color amarillo se determina como una medición de la actividad de proteasa.

[0042] 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 del polipéptido de SEQ ID N.º: 6, SEQ ID N.º: 19 y/o SEQ ID N.º: 24.

[0043] **Identidad de secuencia:** la relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se describe con el parámetro "identidad de secuencia".

[0044] Para los fines de la presente invención, el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando 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 la versión 3.0.0 o posterior. Se utilizó la versión 6.1.0. Los parámetros opcionales usados son una penalización por apertura de espacio de 10, una penalización por extensión de espacio de 0,5 y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión de BLOSUM62 de EMBOSS). El resultado de Needle etiquetado como "identidad más larga" (obtenido utilizando la opción -nobrief) se usa como el porcentaje de identidad y se calcula de la siguiente manera:

$$(\text{Residuos idénticos} \times 100) / (\text{Longitud del alineamiento} - \text{Número total de espacios en el alineamiento})$$

[0045] Para los fines de la presente invención, el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias desoxirribonucleótidas se determina utilizando el algoritmo de 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 la versión 3.0.0 o posterior. Se utilizó la versión 6.1.0. Los parámetros opcionales usados son una penalización por apertura de espacio de 10, una penalización por extensión de espacio de 0,5 y la matriz de sustitución EDNAFULL (versión de NCBI NUC4.4 de EMBOSS). El resultado de Needle etiquetado como "identidad más larga" (obtenido utilizando la opción -nobrief) se usa como el porcentaje de identidad y se calcula de la siguiente manera:

$$(\text{Desoxirribonucleótidos idénticos} \times 100) / (\text{Longitud del alineamiento} - \text{Número total de espacios en el alineamiento})$$

[0046] **Condiciones de astringencia:** las diferentes condiciones de astringencia se definen como sigue.

[0047] El término "condiciones de astringencia muy baja" se refiere, para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, a 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%, siguiendo procedimientos estándares de transferencia de Southern durante 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces, cada vez durante 15 minutos, utilizando SSC 2X, SDS al 0,2% a 45°C.

[0048] El término "condiciones de astringencia baja" se refiere, para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, a 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%, siguiendo procedimientos estándares de transferencia de Southern durante 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces, cada vez durante 15 minutos, utilizando SSC 2X, SDS al 0,2% a 50°C.

[0049] El término "condiciones de astringencia media" se refiere, para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, a 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 35%, siguiendo procedimientos estándares de transferencia de Southern durante 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces, cada vez durante 15 minutos, utilizando SSC 2X, SDS al 0,2% a 55°C.

[0050] El término "condiciones de astringencia media-alta" se refiere, para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, a 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 35%, siguiendo procedimientos estándares de transferencia de Southern durante 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces, cada vez durante 15 minutos, utilizando SSC 2X, SDS al 0,2% a 60°C.

[0051] El término "condiciones de astringencia alta" se refiere, para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, a 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 50%, siguiendo procedimientos estándares de transferencia de Southern durante 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces, cada vez durante 15 minutos, utilizando SSC 2X, SDS al 0,2% a 65°C.

[0052] El término "condiciones de astringencia muy alta" se refiere, para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, a 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 50%, siguiendo procedimientos estándares de transferencia de Southern durante 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces, cada vez durante 15 minutos, utilizando SSC 2X, SDS al 0,2% a 70°C.

[0053] **Subsecuencia:** el término "subsecuencia" se refiere a un polinucleótido con uno o más (por ejemplo, varios) nucleótidos eliminados del extremo 5' y/o 3' de una secuencia codificante del polipéptido maduro; donde la subsecuencia codifica un fragmento que tiene actividad de proteasa. En un aspecto, una subsecuencia

contiene al menos 990 nucleótidos (por ejemplo, los nucleótidos 662 a 1651 de la SEQ ID N.º: 1), por ejemplo, y al menos 1035 nucleótidos (por ejemplo, los nucleótidos 632 a 1666 de la SEQ ID N.º: 1); por ejemplo, y al menos 1065 nucleótidos (por ejemplo, los nucleótidos 617 a 1681 de la SEQ ID N.º: 1).

[0054] **Polinucleótido sustancialmente puro:** el término "polinucleótido sustancialmente puro" se refiere a una preparación de polinucleótido libre de otros nucleótidos extraños o no deseados y en una forma adecuada para el uso en sistemas de producción de polipéptidos genéticamente modificados. Así, 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% y como máximo un 0,5% en peso de otro material polinucleotídico con el cual se asocia originalmente o por recombinación. Un polinucleótido sustancialmente puro puede incluir, no obstante, regiones 5'- y 3'- no traducidas de origen natural, tales como promotores y terminadores. Preferiblemente, el polinucleótido es al menos un 90% puro, por ejemplo, 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 o 100% puro en peso. Los polinucleótidos de la presente invención están preferiblemente en una forma sustancialmente pura.

[0055] **Polipéptido sustancialmente puro:** el término "polipéptido sustancialmente puro" se refiere a una preparación 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 cual se asocia originalmente o por recombinación. Preferiblemente, el polipéptido es al menos un 92% puro, por ejemplo, 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%, al menos un 99,5% puro, y 100% puro en peso del material polipeptídico total presente en la preparación. 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 tradicionales de purificación.

[0056] **Variante:** el término "variante" se refiere a un polipéptido con actividad de proteasa que incluye una modificación, es decir, una sustitución, inserción y/o delección de uno o más (varios) residuos aminoácidos en una o más (varias) posiciones. Una sustitución se refiere a una sustitución de un aminoácido que ocupa una posición por un aminoácido diferente; una delección se refiere a la eliminación de un aminoácido que ocupa una posición; y una inserción se refiere a la adición de 1-3 aminoácidos adyacentes a un aminoácido que ocupa una posición. Las variantes 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% o al menos el 100% de la actividad de proteasa del polipéptido de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4.

## Descripción detallada de la invención

### Polipéptidos con actividad de proteasa

[0057] Los polipéptidos con actividad de proteasa, o proteasas, también se designan a veces como peptidasas, proteinasas, péptido hidrolasas o enzimas proteolíticas. Las proteasas pueden ser del tipo exo que hidrolizan péptidos empezando por cualquier extremo de las mismas, o del tipo endo que actúan internamente en las cadenas polipeptídicas (endopeptidasas). Las endopeptidasas muestran actividad en sustratos peptídicos bloqueados en los extremos N- y C-terminales que son relevantes para la especificidad de la proteasa en cuestión.

[0058] El término "proteasa" se define en la presente como una enzima que hidroliza enlaces peptídicos. Esta definición de proteasa también se aplica a la parte relativa a la proteasa de los términos "proteasa parental" y "variante de proteasa", tal como se usan en la presente. El término "proteasa" incluye cualquier enzima perteneciente al grupo enzimático EC 3.4 (incluyendo cada una de las dieciocho subclases del mismo). El número EC se refiere a la nomenclatura enzimática de 1992 de NC-IUBBM, Academic Press, San Diego, California, incluyendo los suplementos 1-5 publicados en 1994, Eur. J. Biochem. 223: 1-5, 1995, Eur. J. Biochem. 232: 1-6, 1996, Eur. J. Biochem. 237: 1-5, 1997, Eur. J. Biochem. 250: 1-6; y 1999, Eur. J. Biochem. 264: 610-650 respectivamente. La nomenclatura se suplementa y se actualiza regularmente; véase, por ejemplo, la red informática mundial (WWW) en <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/index.html>.

[0059] Las proteasas de la invención y para el uso según la invención son seleccionadas del grupo constituido por:

- (a) proteasas del grupo enzimático EC 3.4.21.; y/o
- (b) proteasas del grupo enzimático EC 3.4.14.; y/o

(c) serinproteasas de la familia S53 de las peptidasas que comprende dos tipos diferentes de peptidasas: tripeptidil aminopeptidasas (tipo exo) y endopeptidasas; como se describe en 1993, Biochem. J. 290:205-218 y en la base de datos de proteasas MEROPS, publicación, 9.4 (31 de enero de 2011) (www.merops.ac.uk). La base de datos se describe en Rawlings, N.D., Barrett, A.J. y Bateman, A., 2010, "MEROPS: the peptidase database", Nucl. Acids Res. 38: D227-D233.

[0060] Para determinar si una proteasa dada es una serinproteasa y una proteasa de la familia S53, se hace referencia al manual anterior y los principios indicados en el mismo. Tal determinación puede llevarse a cabo para todos los tipos de proteasas, ya sean proteasas de origen natural o de tipo salvaje; o proteasas genéticamente modificadas o sintéticas.

[0061] La familia de peptidasas S53 contiene endopeptidasas y tripeptidil peptidasas activas en ácido. Los residuos de la tríada catalítica son Glu, Asp, Ser, y hay un residuo ácido adicional, Asp, en el agujero del oxoanión. El orden de los residuos es Glu, Asp, Asp, Ser. El residuo de Ser es el nucleófilo equivalente a la Ser en la tríada Asp, His, Ser de la subtilisina, y el Glu de la tríada es un sustituto de la base general, His, en la subtilisina.

[0062] La mutación de cualquiera de los aminoácidos de la tríada catalítica o el agujero de oxoanión dará lugar a un cambio o una pérdida de actividad enzimática. Los aminoácidos de la tríada catalítica y el agujero de oxoanión de la Proteasa S53 3 de *Meripilus giganteus* (SEQ ID N.º: 5) son probablemente las posiciones Glu-85, Asp-89, Asp-175 y Ser-283. Los aminoácidos de la tríada catalítica y el agujero de oxoanión de la proteasa S53 1 de *Trametes versicolor* (SEQ ID N.º: 19) son probablemente las posiciones Glu-85, Asp-89, Asp-175 y Ser-283. Los aminoácidos de la tríada catalítica y el agujero de oxoanión de la proteasa S53 2 de *Trametes versicolor* (SEQ ID N.º: 24) son probablemente las posiciones Glu-85, Asp-89, Asp-175 y Ser-283.

[0063] Las peptidasas de la familia S53 tienden ser más activas a pH ácido (a diferencia de las subtilisinas homólogas), y esto se puede atribuir a la importancia funcional de los residuos carboxílicos, sobre todo el Asp del agujero de oxoanión. Las secuencias de aminoácidos no son muy similares a aquellas de la familia S8 (es decir, las serin endopeptidasas subtilisinas y homólogas), y esto, considerado junto con los residuos de sitio activo bastante diferentes y el menor pH resultante para la actividad máxima, proporciona una diferencia sustancial a esa familia. El plegamiento de proteínas de la unidad peptidasa para miembros de esta familia se parece al de la subtilisina, que tiene el tipo de clan SB.

[0064] Una nueva proteasa S53 de *Meripilus giganteus* con actividad elevada a pH bajo (3-4) en la harina de maíz y soja se identificó y se clonó en relación a la presente invención. Para determinar si una proteasa dada es una serinproteasa y una proteasa de la familia S53, se hace referencia al manual anterior y los principios indicados en el mismo. Tal determinación puede llevarse a cabo para todos los tipos de proteasas, ya sean proteasas de origen natural o de tipo salvaje; o proteasas genéticamente modificadas o sintéticas.

[0065] La presente invención proporciona polipéptidos que tienen actividad de proteasa y polinucleótidos que codifican los polipéptidos. Las proteasas de la invención son serinproteasas de la familia de peptidasas S53. Las proteasas de la invención muestran propiedades de pH, especialmente propiedades de estabilidad de pH, que las hacen de interés sustancial como candidatos para el uso en piensos para animales y otras aplicaciones.

[0066] Las proteasas de la invención son proteasas ácidas con una preferencia por residuos aminoácidos hidrofóbicos tales como Leu, Tyr, Phe y Met en la posición P1. Las proteasas tienen actividad elevada en Suc-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA y Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA con un amplio intervalo de pH de 2-5 y retienen más del 95% de la actividad tras ser sometidas durante 2 horas a pH tan bajos como 3.

La presente invención se refiere a

un polipéptido aislado que tiene actividad de proteasa, seleccionado del grupo constituido por:

- (a) un polipéptido que tiene al menos un 84% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5;
- (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que tiene al menos un 84% de identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 1;
- (c) una variante del polipéptido de SEQ ID N.º: 5 que comprende una sustitución, delección y/o inserción en una o más posiciones, donde el número total de sustituciones, delecciones y/o inserciones aminoácidas no es superior a 20; y
- d) un fragmento de un polipéptido de (a), (b) o (c) con actividad de proteasa,

en el que el polipéptido tiene una actividad de proteasa mejorada a un pH de entre 3 y 4, a 25°C en comparación con la proteasa NRRL 18262

- [illegible]

[0082] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido que tiene el 100% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4.

5 [0083] La presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4 de al menos un 84%, 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%, que tiene actividad de proteasa. En un aspecto, los polipéptidos difieren en no más de treinta aminoácidos, por ejemplo, en  
10 veinticinco aminoácidos, en veinte aminoácidos, en quince aminoácidos, en doce aminoácidos, en diez aminoácidos, en nueve aminoácidos, en ocho aminoácidos, en siete aminoácidos, en seis aminoácidos, en cinco aminoácidos, en cuatro aminoácidos, en tres aminoácidos, en dos aminoácidos y en un aminoácido con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4.

15 [0084] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido para el uso en piensos para animales que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4.

[0085] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido para el uso en piensos para animales que tiene al menos un 75% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4.

20 [0086] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido para el uso en piensos para animales que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4.

25 [0087] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido para el uso en piensos para animales que tiene al menos un 85% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4.

[0088] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido para el uso en piensos para animales que tiene al menos un 87% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4.

30 [0089] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido para el uso en piensos para animales que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4.

[0090] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido para el uso en piensos para animales que tiene al menos un 91% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4.

35 [0091] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido para el uso en piensos para animales que tiene al menos un 92% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4.

40 [0092] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido para el uso en piensos para animales que tiene al menos un 93% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4.

[0093] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido para el uso en piensos para animales que tiene al menos un 94% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4.

45 [0094] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido para el uso en piensos para animales que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4.

[0095] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido para el uso en piensos para animales que tiene al menos un 96% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4.

5 [0096] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido para el uso en piensos para animales que tiene al menos un 97% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4.

[0097] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido para el uso en piensos para animales que tiene al menos un 98% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4.

10 [0098] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido para el uso en piensos para animales que tiene al menos un 99% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4.

15 [0099] Una forma de realización de la invención es un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido para el uso en piensos para animales que tiene el 100% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4.

20 [0100] La presente invención se refiere al uso en piensos para animales de polipéptidos aislados que tienen una identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4 de al menos un 60%, por ejemplo, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 87%, 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%, que tiene actividad de proteasa. En un aspecto, los polipéptidos difieren en no más de veinte aminoácidos, por ejemplo, en quince aminoácidos, en diez aminoácidos, en ocho aminoácidos, en siete aminoácidos, en seis aminoácidos, en cinco aminoácidos, en cuatro aminoácidos, en tres aminoácidos, en dos aminoácidos y en un aminoácido con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4.

25 [0101] En una forma de realización particular, la presente invención también se refiere a un método para preparar un pienso para animales o aditivo para piensos, que comprende la preparación de una composición de pienso para animales o de aditivo para piensos que incluye un pienso para animales y un polipéptido aislado que tiene actividad de proteasa, seleccionado del grupo constituido por:

- 30 (a) un polipéptido que tiene al menos un 84% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5;
- (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que tiene al menos un 84% de identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 1;
- (c) una variante del polipéptido de SEQ ID N.º: 5 que comprende una sustitución, delección y/o inserción en una o más posiciones, donde el número total de sustituciones, delecciones y/o inserciones aminoacídicas no es superior a 20; y
- 35 (d) un fragmento de un polipéptido de (a), (b) o (c) que tiene actividad de proteasa,

en el que el polipéptido tiene una actividad de proteasa mejorada a un pH de entre 3 y 4, a 25°C en comparación con la proteasa NRRL 18262. La presente invención también se refiere a una composición de pienso para animales o de aditivo para piensos que comprende un pienso para animales y un polipéptido aislado que tiene actividad de proteasa, seleccionado del grupo constituido por:

- 40 (a) un polipéptido que tiene al menos un 84% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5;
- (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que tiene al menos un 84% de identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 1;
- (c) una variante del polipéptido de SEQ ID N.º: 5 que comprende una sustitución, delección y/o inserción en una o más posiciones, donde el número total de sustituciones, delecciones y/o inserciones aminoacídicas no es superior a 20; y
- 45 (d) un fragmento de un polipéptido de (a), (b) o (c) que tiene actividad de proteasa,

donde el polipéptido tiene una actividad de proteasa mejorada a un pH de entre 3 y 4, a 25°C en comparación con la proteasa NRRL 18262.

50 [0102] En un aspecto, los polipéptidos difieren en no más de veinte aminoácidos, por ejemplo, en quince aminoácidos, en diez aminoácidos, en ocho aminoácidos, en siete aminoácidos, en seis aminoácidos, en cinco

aminoácidos, en cuatro aminoácidos, en tres aminoácidos, en dos aminoácidos y en un aminoácido con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4.

[0103] Las composiciones de piensos para animales pueden, en formas de realización particulares, estar en forma de un granulado, un triturado o una composición líquida, como se describe más adelante en la presente.

- 5 [0104] Un polipéptido de la presente invención comprende o consiste preferiblemente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4, una variante alélica de la misma; o es un fragmento al que le faltan, por ejemplo, 30, 25, 20, 15, 10 o 5 aminoácidos del extremo N- y/o C-terminal y que tiene actividad de proteasa. En otro aspecto, el polipéptido comprende o  
10 consiste en el polipéptido de SEQ ID N.º: 5. En otro aspecto preferido, el polipéptido comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 366 de la SEQ ID N.º: 2.

- [0105] La presente invención también se refiere a polipéptidos aislados que tienen actividad de proteasa que están codificados por polinucleótidos que hibridan bajo condiciones de astringencia baja, condiciones de astringencia media, condiciones de astringencia media-alta, condiciones de astringencia alta o condiciones de astringencia muy alta con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 1, o (ii) la cadena  
15 complementaria en toda su longitud de (i) (J. Sambrook, E.F. Fritsch y T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d edition, Cold Spring Harbor, Nueva York).

- [0106] El polinucleótido de SEQ ID N.º: 1, así como la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, SEQ ID N.º: 19, SEQ ID N.º: 24, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2, o SEQ ID N.º: 4, o un fragmento de los mismos, se pueden utilizar para diseñar sondas de ácido nucleico para identificar y clonar ADN que codifica  
20 polipéptidos que tienen actividad de proteasa de cepas de diferentes géneros o especies según métodos bien conocidos en la técnica. En particular, tales sondas se pueden usar para la hibridación con el ADN genómico o ADNc del género o especie de interés, siguiendo procedimientos de transferencia de Southern estándares, para identificar y aislar el gen correspondiente en el mismo. Tales sondas pueden ser considerablemente más cortas que la secuencia entera, pero debería ser de al menos 14, por ejemplo, al menos 25, al menos 35, o al menos 70  
25 nucleótidos de longitud. Preferiblemente, la sonda de ácido nucleico es de al menos 100 nucleótidos de longitud, por ejemplo, al menos 200 nucleótidos, al menos 300 nucleótidos, al menos 400 nucleótidos, al menos 500 nucleótidos, al menos 600 nucleótidos, al menos 700 nucleótidos, al menos 800 nucleótidos, o al menos 900 nucleótidos de longitud. Se pueden usar tanto sondas de ADN como de ARN. Las sondas se marcan típicamente para la detección del gen correspondiente (por ejemplo, con <sup>32</sup>P, <sup>3</sup>H, <sup>35</sup>S, biotina o avidina). La presente  
30 invención abarca tales sondas.

- [0107] Se puede cribar una genoteca de ADN genómico o ADNc preparada a partir de tales otras cepas para seleccionar ADN que hibride con las sondas descritas anteriormente y que codifique un polipéptido con actividad de proteasa. El ADN genómico o de otro tipo de tales otras cepas se puede separar por electroforesis en gel de poliacrilamida o agarosa, u otras técnicas de separación. El ADN de las genotecas o el ADN separado se puede  
35 transferir e inmovilizar en nitrocelulosa u otro material portador adecuado. Para identificar un clon o ADN que sea homólogo a la SEQ ID N.º: 1, SEQ ID N.º: 15 o SEQ ID N.º: 20 o una subsecuencia de las mismas, el material portador se usa preferiblemente en una transferencia de Southern.

- [0108] Para los fines de la presente invención, la hibridación indica que el polinucleótido hibrida con una sonda de ácido nucleico marcada que corresponde a la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 1, SEQ ID N.º: 15 o SEQ ID N.º: 20, su cadena complementaria en toda su longitud o una subsecuencia de la  
40 misma bajo condiciones de astringencia muy baja a muy alta. Las moléculas con las que la sonda de ácido nucleico hibrida bajo estas condiciones se pueden detectar utilizando, por ejemplo, película radiográfica o cualquiera de los otros medios de detección conocidos en la técnica.

- [0109] En un aspecto, la sonda de ácido nucleico es la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 1, SEQ ID N.º: 15 o SEQ ID N.º: 20. En otro aspecto, la sonda de ácido nucleico es un fragmento de la misma. En otro aspecto, la sonda de ácido nucleico es un polinucleótido que codifica el polipéptido de SEQ ID N.º: 2, SEQ ID N.º: 16, SEQ ID N.º: 21 o un fragmento del mismo. En otro aspecto preferido, la sonda de ácido  
45 nucleico es la SEQ ID N.º: 1, SEQ ID N.º: 15 o SEQ ID N.º: 20.

- [0110] Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, las condiciones de astringencia alta a muy alta se definen 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, o formamida al 25% para astringencias muy bajas y  
50 bajas, o formamida al 35% para astringencias medias y medias-altas, o formamida al 50% para astringencias altas y muy altas, siguiendo procedimientos de transferencia de Southern estándares durante 12 a 24 horas óptimamente. El material portador se lava finalmente tres veces, cada vez durante 15 minutos, utilizando SSC 2X, SDS al 0,2% a 65°C (astringencia alta) y a 70°C (astringencia muy alta).  
55

[0111] Para sondas cortas de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, las condiciones de astringencia se definen como prehibridación e hibridación a aproximadamente 5°C hasta aproximadamente 10°C por debajo de la  $T_m$  calculada utilizando el cálculo según Bolton y McCarthy (1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:1390) en 0,9 M de NaCl, 0,09 M de Tris-HCl pH 7,6, 6 mM EDTA, NP-40 al 0,5%, solución de Denhardt 1X, 1 mM de pirofosfato de sodio, 1 mM de fosfato monobásico de sodio, 0,1 mM de ATP y 0,2 mg de ARN de levadura por ml siguiendo procedimientos de transferencia de Southern estándares durante 12 a 24 horas óptimamente. El material portador se lava finalmente una vez en SCC 6X más SDS al 0,1% durante 15 minutos y dos veces, cada vez durante 15 minutos, utilizando SSC 6X a desde 5°C hasta 10°C por debajo de la  $T_m$  calculada.

[0112] La presente invención también se refiere a polipéptidos aislados con actividad de proteasa codificados por polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 1 de al menos un 84%, 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%.

[0113] En otra forma de realización, la presente invención se refiere a variantes que comprenden una sustitución, delección, y/o inserción en una o más (o varias) posiciones de la SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4, o una secuencia homóloga de las mismas. Los cambios aminoacídicos pueden ser de una naturaleza menor, es decir, sustituciones, inserciones o delecciones aminoacídicas conservadoras que no afectan significativamente al plegamiento y/o la actividad de la proteína; delecciones pequeñas, típicamente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; pequeñas extensiones del extremo amino o carboxilo terminal, tal como un residuo aminoterminal de metionina; un péptido conector pequeño de hasta 20-25 residuos; o una extensión pequeña que facilite la purificación cambiando la carga neta u otra función, tales como una etiqueta de polihistidina o etiqueta HQ, un epítopo antigénico o un dominio de unión.

[0114] Los ejemplos de sustituciones conservadoras se incluyen en el grupo de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina). Las sustituciones aminoacídicas que generalmente no alteran la actividad específica se conocen en la técnica y son descritas, por ejemplo, por H. Neurath y R.L. Hill, 1979, In, The Proteins, Academic Press, Nueva York. Los intercambios que ocurren con más frecuencia que se espera que no alteren sustancialmente la actividad específica son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu y Asp/Gly.

[0115] Alternativamente, los cambios aminoacídicos son de tal naturaleza que alteran las propiedades fisicoquímicas de los polipéptidos. Por ejemplo, los cambios aminoacídicos pueden mejorar la termoestabilidad del polipéptido, alterar la especificidad por el sustrato, cambiar el pH óptimo, y similares.

[0116] Los aminoácidos esenciales en un polipéptido parental se pueden identificar según procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de barrido de alanina (Cunningham and Wells, 1989, Science 244: 1081-1085). En esta última técnica, se introducen mutaciones de una única alanina en cada residuo de la molécula y se determina la actividad de proteasa de las moléculas mutantes resultantes para identificar residuos aminoacídicos que son críticos para la actividad de la molécula. Véase también, Hilton et al., 1996, J. Biol. Chem. 271: 4699-4708. El sitio activo de la enzima u otra interacción biológica también puede determinarse mediante análisis físico de la estructura, como se determina por técnicas tales como la resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrones o marcaje por fotoafinidad, junto con la mutación de aminoácidos del posible 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. La identidad de aminoácidos esenciales también puede inferirse a partir de análisis de identidad con polipéptidos que están relacionados con el polipéptido parental.

[0117] Las sustituciones, delecciones y/o inserciones aminoacídicas únicas o múltiples se pueden realizar y evaluar usando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación y/o recombinación aleatoria, seguido de un procedimiento de cribado relevante, tal como los descritos por Reidhaar-Olson y Sauer, 1988, Science 241: 53-57; Bowie y Sauer, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2152-2156; WO 95/17413; o WO 95/22625. Otros métodos que se pueden usar incluyen PCR propensa a errores, presentación en fagos (por ejemplo, Lowman et al., 1991, Biochemistry 30: 10832-10837; patente de EE.UU. n° 5,223,409; WO 92/06204), y mutagénesis dirigida a la región (Derbyshire et al., 1986, Gene 46: 145; Ner et al., 1988, DNA 7: 127).



- 5 [0118] Los métodos de mutagénesis/recombinación aleatoria pueden combinarse con métodos de cribado automatizados de alto rendimiento para detectar actividad de polipéptidos mutagenizados clonados expresados por células huésped (Ness et al., 1999, Nature Biotechnology 17: 893-896). Las moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos activos se pueden recuperar de las células huésped y secuenciar rápidamente usando métodos estándares en la técnica. Estos métodos permiten determinar con rapidez la importancia de residuos aminoacídicos individuales de un polipéptido.
- 10 [0119] La presente invención también se refiere a variantes de polipéptidos que tienen actividad de proteasa y que tienen al menos un 84%, 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% o al menos un 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4 que comprende al menos una sustitución, delección y/o inserción de al menos uno o más (varios) aminoácidos de la SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4 o una secuencia homóloga de las mismas.
- 15 [0120] El polipéptido variante de la invención puede, en una forma de realización, tener al menos un 85% de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 5.
- [0121] El polipéptido variante de la invención puede, en una forma de realización, tener al menos un 86% de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 5.
- 20 [0122] El polipéptido variante de la invención puede, en una forma de realización, tener al menos un 87% de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 5.
- [0123] El polipéptido variante de la invención puede, en una forma de realización, tener al menos un 88% de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 5.
- [0124] El polipéptido variante de la invención puede, en una forma de realización, tener al menos un 89% de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 5.
- 25 [0125] El polipéptido variante de la invención puede, en una forma de realización, tener al menos un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 5.
- [0126] El polipéptido variante de la invención puede, en una forma de realización, tener al menos un 91 % de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 5.
- 30 [0127] El polipéptido variante de la invención puede, en una forma de realización, tener al menos un 92% de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 5.
- [0128] El polipéptido variante de la invención puede, en una forma de realización, tener al menos un 93% de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 5.
- [0129] El polipéptido variante de la invención puede, en una forma de realización, tener al menos un 94% de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 5.
- 35 [0130] El polipéptido variante de la invención puede, en una forma de realización, tener al menos un 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 5.
- [0131] El polipéptido variante de la invención puede, en una forma de realización, tener al menos un 96% de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 5.
- 40 [0132] El polipéptido variante de la invención puede, en una forma de realización, tener al menos un 97% de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 5.
- [0133] El polipéptido variante de la invención puede, en una forma de realización, tener al menos un 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 5.
- [0134] El polipéptido variante de la invención puede, en una forma de realización, tener al menos un 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 5.

[0135] El número total de sustituciones, deleciones y/o inserciones aminoácídicas del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4 no es superior a 20, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20.

5 [0136] El polipéptido puede ser un polipéptido híbrido en el cual una porción de un polipéptido se fusiona en el extremo N-terminal o el C-terminal de una porción de otro polipéptido.

10 [0137] El polipéptido puede ser un polipéptido de fusión o polipéptido de fusión escindible en el cual otro polipéptido se fusiona en el extremo N-terminal o el C-terminal del polipéptido de la presente invención. Un polipéptido fusionado se produce por fusión de un polinucleótido que codifica otro polipéptido con un polinucleótido de la presente invención. Las técnicas para producir polipéptidos de fusión se conocen en la técnica e incluyen ligar las secuencias codificantes que codifican los polipéptidos de modo que estén en marco y que la expresión del polipéptido fusionado esté bajo control del/los mismo(s) promotor(es) y terminador. Las proteínas de fusión también se pueden construir utilizando tecnología de inteína en la cual las fusiones se crean postraduccionalmente (Cooper et al., 1993, EMBO J. 12: 2575-2583; Dawson et al., 1994, Science 266: 776-779).

15 [0138] Un polipéptido de fusión puede además comprender un sitio de escisión entre los dos polipéptidos. Cuando se secreta la proteína de fusión, el sitio se escinde y se liberan los dos polipéptidos. Los ejemplos de sitios de escisión incluyen, pero de forma no limitativa, los sitios descritos en Martin et al., 2003, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 3: 568-576; Svetina et al., 2000, J. Biotechnol. 76: 245-251; Rasmussen-Wilson et al., 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63: 3488-3493; 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.

25 [0139] El polipéptido puede expresarse por una secuencia de ADN recombinante que contiene la codificación para una etiqueta His o etiqueta HQ para proporcionar, después de cualesquiera modificaciones postraduccionales, el polipéptido maduro que contiene toda o parte de la etiqueta His o HQ. La etiqueta HQ, que tiene la secuencia -RHQHQHQ, puede escindirse completa o parcialmente del polipéptido durante las modificaciones postraduccionales, dando como resultado, por ejemplo, la unión de los aminoácidos adicionales -RHQHQ al extremo C-terminal del polipéptido maduro.

30 [0140] Las moléculas de carbohidrato se unen con frecuencia a un polipéptido procedente de una fuente fúngica durante la modificación postraducciona. Para ayudar al análisis por espectrometría de masas, el polipéptido se puede incubar con una endoglicosidasa para deglicosilar cada posición unida a N. Para cada sitio unido a N deglicosilado, una N-acetil hexosamina permanece en la cadena principal de la proteína.

#### Formas de realización

35 [0141] En determinadas formas de realización de la invención, la proteasa de la invención muestra propiedades térmicas beneficiosas tales como termoestabilidad, estabilidad en vapor, etc. y/o propiedades de pH, tales como estabilidad en ácido, pH óptimo, etc.

[0142] Una forma de realización de la invención consiste en polipéptidos aislados que tienen actividad de proteasa mejorada entre pH 2 y 5, tal como entre pH 2 y 4, preferiblemente entre pH 3 y 5, o más preferiblemente entre pH 3 y 4, a 25°C en comparación con la proteasa 10R.

40 [0143] Una forma de realización adicional de la invención consiste en polipéptidos aislados que tienen actividad de proteasa mejorada a, por ejemplo, 60°C o menos, preferiblemente 50°C o menos, más preferiblemente 37°C o menos; entre 25°C y 60°C, preferiblemente entre 25°C y 50°C; o a 25°C o a 37°C en comparación con la proteasa 10R.

45 [0144] Una forma de realización adicional de la invención es la actividad de proteasa mejorada en harina de soja y maíz entre pH 3,0 y 4,0 a 40°C en comparación con la proteasa 10R.

[0145] Otra forma de realización de la invención es la actividad proteolítica mejorada en la digesta de pollos de engorde expresada como aumento en la cantidad de aminos primarias en la digesta del buche y/o la molleja tras 3 o 1 hora de incubación cuando se compara con una muestra blanco no tratada con proteasa y cuando se compara con una muestra tratada con la proteasa 10R.

50 Propiedades de acidez/alcalinidad

[0146] En determinadas formas de realización de la invención, la proteasa de la invención muestra propiedades beneficiosas relativas al pH, tales como estabilidad en ácido, pH óptimo, etc. La estabilidad de la proteasa a un pH bajo es beneficiosa, ya que la proteasa puede tener actividad en el intestino después de pasar a través del estómago. En una forma de realización de la invención, la proteasa retiene >70% de la actividad, tal como >95% de la actividad tras 2 horas a pH 3 como se determina utilizando el método descrito en el ejemplo 3.

#### Temperatura-actividad

[0147] El perfil de temperatura-actividad de la proteasa se puede determinar como se describe en el ejemplo 3. La actividad a bajas temperaturas (30-40°C) puede ser ventajosa para la digestión de proteínas en un animal.

[0148] En una forma de realización, la invención comprende una proteasa que tiene un perfil de temperatura-actividad a pH 4,0 con actividad relativa de 0,20 o superior a 25°C o actividad relativa de 0,50 o superior a 37°C cuando se compara con la actividad de la proteasa a 50°C (cf. ejemplo 3).

#### Termoestabilidad

[0149] La termoestabilidad se puede determinar como se describe en el ejemplo 6, es decir, usando mediciones de DSC para determinar la temperatura de desnaturalización,  $T_d$ , de la proteína proteasa purificada. La  $T_d$  es indicativa de la termoestabilidad de la proteína: cuanto mayor sea la  $T_d$ , mayor será la termoestabilidad. Por consiguiente, en una forma de realización preferida, la proteasa de la invención tiene una  $T_d$  que es superior a la  $T_d$  de una proteasa de referencia, donde la  $T_d$  se determina en muestras de proteasa purificada (preferiblemente con una pureza de al menos un 90% o 95%, como se determina por SDS-PAGE).

[0150] En formas de realización preferidas, las propiedades térmicas tales como la estabilidad térmica, estabilidad a la temperatura, termoestabilidad, estabilidad en vapor y/o estabilidad de granulación como las proporcionan la actividad residual, temperatura de desnaturalización  $T_d$  u otro parámetro de la proteasa de la invención, son superiores al valor correspondiente, como la actividad residual o  $T_d$ , de la proteasa de SEQ ID N.º: 6, más preferiblemente al menos un 101% del mismo o al menos un 102%, 103%, 104%, 105%, 106%, 107%, 108%, 109%, o al menos un 110% del mismo. Aún más preferiblemente, el valor del parámetro, tal como la actividad residual o  $T_d$ , de la proteasa de la invención es al menos un 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180% o al menos un 190% del valor para la proteasa de SEQ ID N.º: 6.

[0151] En formas de realización particulares adicionales, la proteasa termoestable de la invención tiene una temperatura de fusión,  $T_m$  (o una temperatura de desnaturalización,  $T_d$ ), determinada mediante el uso de calorimetría diferencial de barrido (DSC) como se describe en el ejemplo 10 (es decir, en 20 mM de acetato sódico, pH 4,0), de al menos 50°C. En formas de realización particulares adicionales, la  $T_m$  es al menos 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o al menos 100°C.

#### Estabilidad en vapor

[0152] La estabilidad en vapor se puede determinar como se describe en el ejemplo 7 mediante la determinación de la actividad residual de moléculas de proteasa después de tratar con vapor a 85°C o 90°C durante un tiempo corto.

#### Estabilidad de granulación

[0153] La estabilidad de granulación se puede determinar como se describe en el ejemplo 8 usando un granulado enzimático premezclado con pienso. Desde la mezcladora, el pienso se acondiciona con vapor a 95°C. Después de preparar el pienso, se prensa en gránulos y se determina la actividad residual.

#### **Fuentes de polipéptidos con actividad de proteasa**

[0154] Se puede obtener un polipéptido con actividad de proteasa de la presente invención a partir de hongos de cualquier género. Para los fines de la presente invención, el término "obtenido a partir de" tal como se utiliza en la presente en relación con una fuente dada significará que el polipéptido codificado por un polinucleótido es producido por la fuente o por una cepa en la cual se ha insertado el polinucleótido procedente de la fuente. En un aspecto, el polipéptido obtenido a partir de una fuente dada se secreta extracelularmente.

[0155] El polipéptido puede ser un polipéptido fúngico. Por ejemplo, el polipéptido puede ser un polipéptido con actividad de proteasa procedente de un filo tal como *Basidiomycota*. En un aspecto, el polipéptido es una proteasa procedente de un hongo de la clase *Agaricomycetes*, tal como del orden *Polyporales*, o de la familia *Coriolaceae*, o del género *Meripilus* o del género *Trametes*.

5 [0156] Se entenderá que para las especies anteriormente mencionadas, 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.

10 [0157] Las cepas de estos taxones son fácilmente accesibles al público en varias colecciones de cultivos, tales como la American Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS) y Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

15 [0158] El polipéptido se puede identificar y obtener a partir de otras fuentes incluyendo microorganismos aislados de la naturaleza (por ejemplo, tierra, abonos, agua, etc.) o muestras de ADN obtenidas directamente a partir de materiales naturales (por ejemplo, tierra, abonos, agua, etc.) utilizando las sondas anteriormente mencionadas. Las técnicas para aislar microorganismos y ADN directamente a partir de hábitats naturales son bien conocidas en la técnica. Un polinucleótido que codifica un polipéptido puede obtenerse entonces cribando de forma similar una genoteca de ADN genómico o ADNc de otro microorganismo o muestra de ADN mezclado. Una vez ha sido detectado con la(s) sonda(s) un polinucleótido que codifica un polipéptido, el polinucleótido se puede aislar o  
20 clonar utilizando técnicas que conocen los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, supra).

#### **Polinucleótidos**

[0159] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican un polipéptido de la presente invención.

25 [0160] Las técnicas usadas para aislar o clonar un polinucleótido que codifica un polipéptido se conocen en la técnica e incluyen el aislamiento a partir de ADN genómico, la preparación de ADNc o una combinación de las mismas. La clonación de los polinucleótidos de tal ADN genómico puede efectuarse, por ejemplo, usando la bien conocida reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o el cribado de anticuerpos de bibliotecas de expresión para detectar fragmentos de ADN clonados con características estructurales compartidas. Véase, por ejemplo,  
30 Innis et al., 1990, PCR: A Guide to Methods and Application, Academic Press, Nueva York. Se pueden utilizar otros procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos tales como la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la transcripción activada por ligadura (LAT) y la amplificación basada en polinucleótidos (NASBA). Los polinucleótidos se pueden clonar a partir de una cepa de *Bacillus sp.* u otro organismo relacionado del orden *Bacillales* y así, por ejemplo, puede ser una variante alélica o de especie de la región codificante del polipéptido  
35 del polinucleótido.

[0161] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que comprenden o consisten en polinucleótidos que tienen un grado de identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 1 de al menos un 84%, 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  
40 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%, que codifica un polipéptido que tiene actividad de proteasa.

[0162] 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 del polipéptido que no ocurren de manera natural. Estos polipéptidos  
45 pueden diferir de alguna manera que implique ingeniería a partir del polipéptido aislado de su fuente nativa, por ejemplo, variantes que difieren en la actividad específica, la termoestabilidad, el pH óptimo, o similares. La variante se puede construir basándose en el polinucleótido presentado como la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 1, por ejemplo, una subsecuencia de la misma, y/o por introducción de sustituciones nucleotídicas que no suponen un cambio en la secuencia de aminoácidos del polipéptido, pero que  
50 corresponden al uso de codones del organismo huésped destinado a la producción de la enzima, o por introducción de sustituciones nucleotídicas que pueden dar lugar a una secuencia de aminoácidos diferente. Para una descripción general de la sustitución nucleotídica, véase, por ejemplo, Ford et al., 1991, Protein Expression and Purification 2: 95-107.

[0163] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican polipéptidos de la presente invención, que hibridan bajo condiciones de astringencia muy baja, condiciones de astringencia baja, condiciones de astringencia media, condiciones de astringencia media-alta, condiciones de astringencia alta o condiciones de astringencia muy alta con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 1, (ii) la secuencia de ADN genómico que comprende la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 1, o (iii) la cadena complementaria en toda su longitud de (i) o (ii); o variantes alélicas y subsecuencias de las mismas (Sambrook et al., 1989, *supra*), tal y como se define en la presente.

[0164] En un aspecto, el polinucleótido comprende o consiste en la SEQ ID N.º: 1, la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 1 o una subsecuencia de la SEQ ID N.º: 1 que codifica un fragmento de SEQ ID N.º: 2 con actividad de proteasa, tal como el polinucleótido de los nucleótidos 605 a 1702 de la SEQ ID N.º: 1.

### Constructos de ácido nucleico

[0165] La presente invención también se refiere a constructos de ácido nucleico que comprende un polinucleótido de la presente invención unido operativamente 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.

[0166] Un polinucleótido se puede manipular en una variedad de formas para proveer a la expresión del polipéptido. La manipulación del polinucleótido antes de su inserción en un vector puede ser deseable o necesaria en función del vector de expresión. Las técnicas para modificar polinucleótidos utilizando métodos de ADN recombinante se conocen bien en la técnica.

[0167] 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 transcripcional que median la expresión del polipéptido. El promotor puede ser cualquier polinucleótido que muestre actividad transcripcional en la célula huésped de elección incluyendo promotores mutantes, truncados e híbridos, y puede obtenerse a partir de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares homólogos o heterólogos a la célula huésped.

[0168] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácido nucleico de la presente invención en una célula huésped bacteriana son los promotores obtenidos a partir del gen de la alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (*amyQ*), el gen de la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (*amyL*), el gen de la penicilinas de *Bacillus licheniformis* (*penP*), el gen de la amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus* (*amyM*), el gen de la levansucrasa de *Bacillus subtilis* (*sacB*), los genes *xylA* y *xylB* de *Bacillus subtilis*, el gen *cryIIIA* de *Bacillus thuringiensis* (Agaisse y Lereclus, 1994, *Molecular Microbiology* 13: 97-107), el operón *lac* de *E. coli*, el promotor *trc* de *E. coli* (Egon et al., 1988, *Gene* 69: 301-315), el gen de la agarasa de *Streptomyces coelicolor* (*dagA*) y el gen de la beta-lactamasa procariótica (Villa-Kamaroff et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 3727-3731), así como el promotor *tac* (DeBoer et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 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*. Ejemplos de promotores en tándem se describen en WO 99/43835.

[0169] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácido nucleico de la presente invención en una célula huésped de hongo filamentoso son los promotores obtenidos de los genes de la acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, alfa-amilasa estable en medio ácido de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger* o *Aspergillus awamori* (*glaA*), TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*, proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), amiloglucosidasa de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), *Fusarium venenatum* Daria (WO 00/56900), Quinn de *Fusarium venenatum* (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 incluyendo un gen que codifica una alfa-amilasa neutra de *Aspergilli* en el que la secuencia líder no traducida se ha sustituido por una secuencia líder no traducida de un gen que codifica la triosa fosfato isomerasa en *Aspergilli*; ejemplos no limitativos incluyen promotores modificados incluyendo el gen que codifica la alfa-amilasa neutra en *Aspergillus niger* en el que la secuencia líder no traducida se ha sustituido por una secuencia líder no traducida del gen que codifica la triosa fosfato isomerasa en el *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae*); y promotores mutantes, truncados e híbridos de los mismos.

- 5 [0170] En un huésped de levadura, se obtienen promotores útiles de los genes de la enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), galactocinasa de *Saccharomyces cerevisiae* (GAL1), alcohol dehidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH1, ADH2/GAP), triosa fosfato isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae* (TPI), metalotioneína de *Saccharomyces cerevisiae* (CUP1) y 3-fosfoglicerato cinasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros promotores útiles para células huésped de levadura se describen en Romanos et al., 1992, *Yeast* 8: 423-488.
- 10 [0171] 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 unida operativamente al extremo 3'-terminal del polinucleótido codificante del polipéptido. Cualquier terminador que sea funcional en la célula huésped de elección puede utilizarse en la presente invención.
- [0172] Los terminadores preferidos para células huésped bacterianas se obtienen a partir de los genes de la proteasa alcalina de *Bacillus clausii* (*aprH*), la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (*amyL*) y ARN ribosómico de *Escherichia coli* (*rrnB*).
- 15 [0173] Los terminadores preferidos para células huésped fúngicas filamentosas se obtienen a partir de los genes de la antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.
- 20 [0174] Los terminadores preferidos para células huésped de levadura se obtienen a partir de los genes de la enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, el citocromo C (CYC1) de *Saccharomyces cerevisiae* y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros terminadores útiles para células huésped de levadura se describen en Romanos et al., 1992, *supra*.
- [0175] La secuencia de control también puede ser una región estabilizadora de ARNm corriente abajo de un promotor y corriente arriba de la secuencia codificante de un gen que aumenta la expresión del gen.
- 25 [0176] Ejemplos de regiones estabilizadoras de ARNm adecuadas se obtienen a partir de un gen *cryIIIA* de *Bacillus thuringiensis* (WO 94/25612) y un gen SP82 de *Bacillus subtilis* (Hue et al., 1995, *Journal of Bacteriology* 177: 3465-3471).
- [0177] La secuencia de control también puede ser una secuencia líder, una región no traducida de un ARNm que es importante para la traducción por la célula huésped. La secuencia líder está unida operativamente al extremo 5'-terminal del polinucleótido que codifica el polipéptido. Puede utilizarse cualquier secuencia líder que sea funcional en la célula huésped.
- 30 [0178] Las secuencias líderes preferidas para células huésped fúngicas filamentosas se obtienen a partir de los genes de la TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y y la triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.
- 35 [0179] Las secuencias líderes adecuadas para células huésped de levadura se obtienen a partir de los genes de la enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), 3-fosfoglicerato cinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, el factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* y la alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH2/GAP).
- [0180] La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia unida operativamente al extremo 3'-terminal del polinucleótido y, cuando se transcribe, la célula huésped la reconoce 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.
- 40 [0181] Las secuencias de poliadenilación preferidas para células huésped fúngicas filamentosas se obtienen a partir de los genes de la TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* y alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*.
- 45 [0182] Las secuencias de poliadenilación útiles para células huésped de levadura se describen en Guo y Sherman, 1995, *Mol. Cellular Biol.* 15: 5983-5990.
- [0183] La secuencia de control también puede ser una región codificante del péptido señal que codifica un péptido señal unido al extremo N-terminal de un polipéptido y dirige el polipéptido a la vía secretora de la célula. El extremo 5' de la secuencia codificante del polinucleótido puede contener intrínsecamente una secuencia

codificante del péptido señal naturalmente unida en el marco de lectura de traducción con el segmento de la secuencia codificante que codifica el polipéptido. Alternativamente, el extremo 5' de la secuencia codificante puede contener una secuencia codificante del péptido señal que es exógena a la secuencia codificante. La secuencia codificante del péptido señal exógena puede requerirse donde la secuencia codificante no contiene de manera natural una secuencia codificante del péptido señal. Alternativamente, la secuencia codificante del péptido señal exógena puede simplemente reemplazar la secuencia codificante del péptido señal natural para mejorar la secreción del polipéptido. Sin embargo, se puede utilizar cualquier secuencia codificante del péptido señal que dirija el polipéptido expresado a la vía secretora de una célula huésped de elección.

[0184] Secuencias codificantes del péptido señal eficaces para células huésped bacterianas son las secuencias codificantes del péptido señal obtenidas a partir de los genes de la amilasa maltogénica de *Bacillus* NCIB 11837, subtilisina de *Bacillus licheniformis*, beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis*, alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, proteasas neutras de *Bacillus stearothermophilus* (*nprT*, *nprS*, *nprM*), *prsA* de *Bacillus subtilis* y *Bacillus lentus*. Se describen péptidos señal adicionales en Simonen y Palva, 1993, Microbiological Reviews 57: 109-137.

[0185] Secuencias codificantes del péptido señal eficaces para células huésped fúngicas filamentosas son las secuencias codificantes del péptido señal obtenidas a partir de los genes de la amilasa neutra de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, celulasa de *Humicola insolens*, endoglucanasa V de *Humicola insolens*, lipasa de *Humicola lanuginosa* y proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*.

[0186] Se obtienen péptidos señal útiles para células huésped de levadura a partir de los genes del factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* y la invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Se describen otras secuencias codificantes del péptido señal útiles en Romanos et al., 1992, *supra*.

[0187] La secuencia de control también puede ser una secuencia codificante del propéptido que codifica un propéptido situado en el extremo N-terminal de un polipéptido. El polipéptido resultante se conoce como una proenzima o propolipéptido (o un zimógeno en algunos casos). Generalmente, un propolipéptido es inactivo y se puede convertir 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 la proteasa alcalina de *Bacillus subtilis* (*aprE*), la proteasa neutra de *Bacillus subtilis* (*nprT*), la lacasa de *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836), la proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei* y el factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*.

[0188] Cuando tanto el péptido señal como las secuencias de propéptido están presentes en el extremo N-terminal de un polipéptido, la secuencia de propéptido está situada junto al extremo N-terminal de un polipéptido y la secuencia de péptido señal está situada junto al extremo N-terminal de la secuencia de propéptido.

[0189] 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 causan que la expresión del gen se active o se desactive en respuesta a un estímulo químico o físico, incluyendo la presencia de un compuesto regulador. Los sistemas reguladores en sistemas procarióticos incluyen los sistemas operadores *lac*, *tac* y *trp*. En levaduras, puede utilizarse el sistema ADH2 o el sistema GAL1. En hongos filamentosos, pueden utilizarse el promotor de la glucoamilasa de *Aspergillus niger*, el promotor de la TAKA alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae* y el promotor de la glucoamilasa de *Aspergillus oryzae*. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son aquellas que permiten la amplificación génica. En sistemas eucarióticos, 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 unido operativamente a la secuencia reguladora.

### Vectores de expresión

[0190] La presente invención también se refiere a vectores de expresión recombinantes que comprenden un polinucleótido de la presente invención, un promotor y señales de terminación transcripcional y traduccional. Las varias secuencias de nucleótidos y de control se pueden unir 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 codificante del polipéptido en tales sitios. Alternativamente, el polinucleótido se puede expresar mediante la inserción del polinucleótido o un constructo de ácido nucleico que comprende la secuencia en un vector apropiado para la expresión. En la creación del vector de expresión, la secuencia codificante se localiza en el vector de modo que la secuencia codificante esté unida operativamente a las secuencias de control apropiadas para la expresión.

[0191] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o virus) que pueda someterse convenientemente a procedimientos de ADN recombinante y pueda provocar la expresión del polinucleótido. La elección del vector dependerá típicamente de la compatibilidad del vector con la célula huésped en la que el vector se va a introducir. El vector puede ser un plásmido lineal o circular cerrado .

5 [0192] El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, la replicación del cual es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula huésped, se integra en el genoma y se replica junto con el/los cromosoma(s) en  
10 que se ha integrado. Además, se pueden utilizar un vector o plásmido único o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ADN total que se va a introducir en el genoma de la célula huésped, o un transposón.

[0193] El vector contiene preferiblemente uno o más (varios) marcadores seleccionables que permiten la selección fácil de células transformadas, transfectadas, transducidas o similares. Un marcador seleccionable es un gen el producto del cual proporciona resistencia vírica o a biocidas, resistencia a metales pesados, prototrofia  
15 a auxótrofos y similares.

[0194] Ejemplos de marcadores seleccionables bacterianos son los genes *dal* de *Bacillus licheniformis* o *Bacillus subtilis*, o marcadores que confieren resistencia antibiótica tal como resistencia a ampicilina, cloranfenicol, kanamicina, neomicina, espectinomicina o tetraciclina. Marcadores adecuados para células huésped de levadura incluyen, pero de forma no limitativa, ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 y URA3. Marcadores  
20 seleccionables para el uso en una célula huésped fúngica filamentosa incluyen, pero de forma no limitativa, *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina-carbamoyltransferasa), *bar* (fosfotricina 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. Los genes *amdS* y *pyrG* de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y el gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus* se prefieren para uso en  
25 una célula de *Aspergillus*

[0195] El vector contiene preferiblemente un elemento(s) que permite(n) la integración del vector en el genoma de la célula huésped o la replicación autónoma del vector en la célula independientemente del genoma.

[0196] Para la integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede depender de la secuencia codificante del polinucleótido del polipéptido o cualquier otro elemento del vector para la integración en el  
30 genoma por recombinación homóloga o no homóloga. Alternativamente, el vector puede contener polinucleótidos adicionales para dirigir la integración por recombinación homóloga en el genoma de la célula huésped en una ubicación(es) precisa(s) en el/los cromosoma(s). Para aumentar la probabilidad de integración en una ubicación precisa, los elementos integracionales deberían contener un número suficiente de ácidos nucleicos, tal como de 100 a 10.000 pares de bases, de 400 a 10.000 pares de bases y de 800 a 10.000 pares de bases, que tienen un  
35 alto grado de identidad de secuencia con la secuencia diana correspondiente para aumentar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos integradores pueden ser cualquier secuencia que sea homóloga a la secuencia diana en el genoma de la célula huésped. Además, los elementos integradores pueden ser polinucleótidos codificantes o no codificantes. Por otro lado, el vector se puede integrar en el genoma de la célula huésped por recombinación no homóloga.

[0197] Para la replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación que permite al vector replicarse autónomamente en la célula huésped en cuestión. El origen de replicación puede ser cualquier replicador de plásmido que media la replicación autónoma que funcione en una célula. El término "origen de replicación" o "replicador de plásmido" se refiere a un polinucleótido que permite que un plásmido o vector se replique in vivo.

45 [0198] Ejemplos de orígenes bacterianos de replicación son los orígenes de replicación de los plásmidos pBR322, pUC19, pACYC177 y pACYC184 que permiten la replicación en *E. Coli*, y pUB110, pE194, pTA1060 y pAMβ1 que permiten la replicación en *Bacillus*.

[0199] Ejemplos de orígenes de replicación para el uso en una célula huésped de levadura son los orígenes de replicación de 2 micras, ARS1, ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3, y la combinación de ARS4 y CEN6.

50 [0200] 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 conseguirse según los métodos descritos en WO 00/24883.



[0201] Se puede insertar más de una copia de un polinucleótido de la presente invención en la célula huésped para aumentar 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, así, copias adicionales del polinucleótido, se pueden seleccionar por cultivo de las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

[0202] Los procedimientos usados para unir los elementos anteriormente descritos para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención son bien conocidos por un experto en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, *supra*).

## **Células huésped**

[0203] La presente invención también se refiere a células huésped recombinantes, que comprenden un polinucleótido de la presente invención unido operativamente 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 modo que el constructo o vector se mantiene como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico autorreplicativo como se ha descrito anteriormente. El término "célula huésped" abarca cualquier progenie de una célula parental que no es idéntico a la célula parental debido a mutaciones que ocurren durante la replicación. La elección de una célula huésped dependerá en gran parte del gen codificante del polipéptido y su fuente.

[0204] La célula huésped puede ser cualquier célula útil en la producción recombinante de un polipéptido de la presente invención, por ejemplo, una procariota o una eucariota.

[0205] La célula huésped procariótica puede ser cualquier bacteria grampositiva o gramnegativa. Las bacterias grampositivas incluyen, pero de forma no limitativa, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Streptomyces*. Las bacterias gramnegativas incluyen, pero de forma no limitativa, *Campylobacter*, *E. Coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Helicobacter*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella* y *Ureaplasma*.

[0206] La célula huésped bacteriana puede ser cualquier célula de *Bacillus*, incluyendo, pero de forma no limitativa, células de *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*.

[0207] La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptococcus*, incluyendo, pero de forma no limitativa, células de *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus equi* subesp. *Zooepidemicus*.

[0208] La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptomyces*, incluyendo, pero de forma no limitativa, células de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus* y *Streptomyces lividans*.

[0209] La introducción de ADN en una célula de *Bacillus* puede, por ejemplo, efectuarse por transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, Chang y Cohen, 1979, Mol. Gen. Genet. 168: 111-115), usando células competentes (véase, por ejemplo, Young y Spizizen, 1961, J. Bacteriol. 81: 823-829, o Dubnau y Davidoff-Abelson, 1971, J. Mol. Biol. 56: 209-221), por electroporación (véase, por ejemplo, Shigekawa y Dower, 1988, Biotechniques 6: 742-751), o por conjugación (véase, por ejemplo, Koehler y Thorne, 1987, J. Bacteriol. 169: 5271-5278). La introducción de ADN en una célula de *E. coli* puede, por ejemplo, efectuarse por transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166: 557-580) o electroporación (véase, por ejemplo, Dower et al., 1988, Nucleic Acids Res. 16: 6127-6145). La introducción de ADN en una célula de *Streptomyces* puede, por ejemplo, efectuarse por transformación de protoplastos y electroporación (véase, por ejemplo, Gong et al., 2004, Folia Microbiol. (Praha) 49: 399-405), por conjugación (véase, por ejemplo, Mazodier et al., 1989, J. Bacteriol. 171: 3583-3585), o por transducción (véase, por ejemplo, Burke et al., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 6289-6294). La introducción de ADN en una célula de *Pseudomonas* puede, por ejemplo, efectuarse por electroporación (véase, por ejemplo, Choi et al., 2006, J. Microbiol. Methods 64: 391-397) o por conjugación (véase, por ejemplo, Pinedo y Smets, 2005, Appl. Environ. Microbiol. 71: 51-57). La introducción de ADN en una célula de *Streptococcus* puede, por ejemplo, efectuarse por competencia natural (véase, por ejemplo, Perry and Kuramitsu, 1981, Infect. Immun. 32: 1295-1297), por transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, Catt y Jollick, 1991, Microbios 68: 189-207), por electroporación (véase, por ejemplo, Buckley et al., 1999, Appl. Environ. Microbiol. 65: 3800-3804) o por conjugación (véase, por ejemplo, Clewell, 1981, Microbiol.

Rev. 45: 409-436). Sin embargo, puede usarse cualquier método conocido en la técnica para introducir ADN en una célula huésped.

[0210] La célula huésped también puede ser una célula eucariota, tal como de mamífero, de insecto, de planta o fúngica.

5 [0211] La célula huésped puede ser una célula fúngica. Los "hongos" tal como se utilizan en este caso incluye los filos *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* y *Zygomycota* (como se definen 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 hongos *Oomycota* (como se cita en Hawksworth et al., 1995, supra, página 171) y todos los mitospóricos (Hawksworth et al., 1995, supra).

10 [0212] La célula huésped fúngica puede ser una célula de levadura. La "levadura" como se utiliza en la presente incluye levadura ascoesporógena (Endomycetales), levadura basidioesporógena y levadura perteneciente a los Fungi Imperfecti (Blastomycetes). Ya que la clasificación de levaduras puede cambiar en el futuro, para los fines de esta invención, la levadura debe definirse como se describe en Biology and Activities of Yeast (Skinner, F.A., Passmore, S.M. y Davenport, R.R., eds, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series No. 9, 1980).

15 [0213] 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*.

20 [0214] 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 por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo se produce por crecimiento hifal y el catabolismo de carbono es aeróbico estricto. En cambio, el crecimiento vegetativo de las levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* se produce por gemación de un talo unicelular y el catabolismo de carbono puede ser fermentativo.

25 [0215] 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*.

30 [0216] 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*,  
35 *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*,  
40 *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus eryngii*, *Thielavia terrestris*, *Trametes villosa*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*. Una célula huésped preferida en concreto es una  
45 célula de *Aspergillus oryzae*.

50 [0217] Las células fúngicas se pueden transformar por 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*. Se describen procedimientos adecuados para la transformación de células huésped de *Aspergillus* y *Trichoderma* en EP 238023 y Yelton et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1470-1474. Se describen métodos adecuados para transformar especies de *Fusarium* en Malardier et al., 1989, Gene 78: 147-156 y WO 96/00787. Se puede transformar levadura utilizando los procedimientos descritos en Becker y Guarente, In Abelson, J.N. y Simon, M.I., editores, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, volumen 194, págs. 182-187, Academic Press, Inc., Nueva York; Ito et al., 1983, J. Bacteriol. 153: 163; y Hinnen et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1920.

**Métodos de producción**

5 [0218] La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención, que comprenden: (a) el cultivo de una célula, que en su forma de tipo salvaje produce el polipéptido, bajo condiciones que conducen a la producción del polipéptido; y (b) la recuperación del polipéptido. En un aspecto preferido, la célula es del género *Bacillus*. En un aspecto más preferido, la célula es *Bacillus* sp-19138.

[0219] La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención, que comprenden: (a) el cultivo de una célula huésped recombinante de la presente invención bajo condiciones que conducen a la producción del polipéptido; y (b) la recuperación del polipéptido.

10 [0220] Las células huésped se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción del polipéptido utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula se puede cultivar mediante cultivo en matraces en agitación y mediante fermentación a pequeña o gran escala (incluyendo fermentación en continuo, por lotes, por lotes alimentados o en estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales realizada en un medio adecuado y en condiciones que permitan que se exprese y/o se aísle el polipéptido. El cultivo tiene lugar en un medio nutritivo adecuado que comprende fuentes de nitrógeno y carbono y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Los medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según composiciones publicadas (por ejemplo, en catálogos de la American Type Culture Collection). Si el polipéptido se segrega en el medio nutritivo, el polipéptido se puede recuperar directamente del medio. Si el polipéptido no se segrega, se puede recuperar de lisados celulares.

20 [0221] Se proporcionan más detalles en la sección de "constructos de ácido nucleico, vectores de expresión, células huésped recombinantes y métodos para la producción de proteasas" más adelante.

[0222] El polipéptido se puede detectar utilizando métodos conocidos en la técnica que son específicos para los polipéptidos. Estos métodos de detección pueden incluir el uso de anticuerpos específicos, la formación de un producto enzimático o la desaparición de un sustrato enzimático. Por ejemplo, se puede utilizar un ensayo enzimático para determinar la actividad del polipéptido.

25 [0223] El polipéptido se puede recuperar utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido se puede recuperar del medio nutritivo por procedimientos convencionales incluyendo, pero de forma no limitativa, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación.

30 [0224] El polipéptido puede purificarse por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero de forma no limitativa, cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, de afinidad, hidrofóbica, cromatografía de exclusión por tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectroenfoque preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación de sulfato amónico), SDS-PAGE o extracción (véase, por ejemplo, *Protein Purification*, J.-C. Janson and Lars Ryden, editores, VCH Publishers, Nueva York, 1989) para obtener polipéptidos sustancialmente puros.

35 [0225] En un aspecto alternativo, el polipéptido no se recupera, sino que una célula huésped de la presente invención que expresa un polipéptido se usa como una fuente del polipéptido.

**Plantas**

40 [0226] La presente invención también se refiere a plantas, por ejemplo, una planta transgénica, parte de una planta o célula vegetal, que comprenden un polinucleótido aislado de la presente invención para expresar y producir el polipéptido en cantidades recuperables. El polipéptido se puede recuperar de la planta o parte de una planta. Alternativamente, la planta o parte de una planta que contiene el polipéptido se puede utilizar como tal para mejorar la calidad de un alimento o pienso, por ejemplo, mejorando el valor nutricional, la palatabilidad y las propiedades reológicas, o para destruir un factor antinutritivo.

45 [0227] La planta transgénica puede ser dicotiledónea (una dicotiledón) o monocotiledónea (una monocotiledón). Los ejemplos de plantas monocotiledóneas son hierbas, tales como poa de los prados (pasto azul, *Poa*), hierbas forrajeras tales como *Festuca*, *Lolium*, hierbas de zonas templadas, tales como *Agrostis*, y cereales, por ejemplo, trigo, avena, centeno, cebada, arroz, sorgo y maíz.

[0228] Ejemplos de plantas dicotiledóneas son el tabaco, las leguminosas, tales como los altramuces, la patata, la remolacha azucarera, el guisante, la judía y la soja, y plantas crucíferas (familia *Brassicaceae*), tales como la coliflor, la colza y el organismo modelo estrechamente relacionado *Arabidopsis thaliana*.

[0229] Ejemplos de partes de una planta son el tallo, el callo, las hojas, la raíz, los frutos, las semillas y los tubérculos así como los tejidos individuales que comprenden estas partes, por ejemplo, la epidermis, el mesófilo, el parénquima, los tejidos vasculares, los meristemos. Los compartimentos específicos de células vegetales, tales como cloroplastos, apoplastos, mitocondrias, vacuolas, peroxisomas y citoplasma también se consideran partes de una planta. Además, cualquier célula vegetal, cualquiera que sea el origen del tejido, se considera una parte de una planta. Asimismo, partes de una planta tales como tejidos específicos y células aisladas para facilitar la utilización de la invención también se consideran partes de una planta, por ejemplo, embriones, endospermas, la aleurona y cubiertas de semillas.

[0230] También se incluyen dentro del alcance de la presente invención la progenie de tales plantas, partes de plantas y células vegetales.

[0231] La planta o célula vegetal transgénica que expresa un polipéptido se puede construir conforme a métodos conocidos en la técnica. En resumen, la planta o célula vegetal se construye incorporando uno o más (varios) constructos de expresión que codifican un polipéptido en el genoma huésped de la planta o genoma de cloroplasto y propagando la planta o célula vegetal modificada resultante en una planta o célula vegetal transgénica.

[0232] El constructo de expresión es, convenientemente, un constructo de ácido nucleico que comprende un polinucleótido codificante de un polipéptido unido operativamente a secuencias reguladoras apropiadas requeridas para la expresión del polinucleótido en la planta o parte de una planta de elección. 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 (esto último depende del método de introducción de ADN que se vaya a utilizar).

[0233] La elección de secuencias reguladoras, tales como secuencias promotoras y terminadoras y, opcionalmente, secuencias señal o de tránsito, se determina, por ejemplo, de acuerdo a cuándo, dónde y cómo se desea que se exprese el polipéptido. Por ejemplo, la expresión del gen codificante de un polipéptido puede ser constitutiva o inducible, o puede ser específica del desarrollo, fase o tejido, y el producto génico puede dirigirse a un tejido o parte de una planta específicos tales como las semillas u hojas. Se describen secuencias reguladoras, por ejemplo, en Tague et al., 1988, *Plant Physiology* 86: 506.

[0234] Para la expresión constitutiva, se pueden utilizar los promotores 35S-CaMV, de la ubiquitina 1 de maíz y de la actina 1 del 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 sumidero metabólicos tales como los meristemos (Ito et al., 1994, *Plant Mol. Biol.* 24: 863-878), un promotor específico de semillas tales como el promotor de la 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 del cuerpo oleoso de semillas (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 de semillas conocido en la técnica, por ejemplo, como se describe en WO 91/14772. Además, el promotor puede ser un promotor específico de hoja tal como el promotor *rbcs* de arroz o tomate (Kyoizuka et al., 1993, *Plant Physiol.* 102: 991-1000), el promotor del gen de la adenina metiltransferasa del virus *chlorella* (Mittra e 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 heridas tal como el promotor *pin2* de la patata (Xu et al., 1993, *Plant Mol. Biol.* 22: 573-588). Asimismo, el promotor puede ser inducible por tratamientos abióticos tales como la temperatura, sequía o alteraciones en la salinidad o inducido por sustancias aplicadas de forma exógena que activan el promotor, por ejemplo, etanol, estrógenos, hormonas vegetales tales como etileno, ácido abscísico y ácido giberélico, y metales pesados.

[0235] También se puede usar un elemento potenciador del promotor para conseguir una expresión mayor de un polipéptido en la planta. Por ejemplo, el elemento potenciador del promotor puede ser un intrón que se sitúa entre el promotor y el polinucleótido codificante de un polipéptido. Por ejemplo, Xu et al., 1993, *supra*, describen el uso del primer intrón del gen de la actina 1 del arroz para aumentar la expresión.

[0236] El gen marcador seleccionable y cualquiera de las otras partes del constructo de expresión se pueden elegir de aquellos disponibles en la técnica.

[0237] El constructo de ácido nucleico se incorpora en el genoma de la planta según 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).

[0238] Actualmente, la transferencia génica mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es el método de elección para generar dicotiledóneas transgénicas (para una revisión, véase Hooykas y Schilperoort, 1992, Plant Mol. Biol. 19: 15-38) y también pueden usarse para transformar monocotiledóneas, aunque con frecuencia se usan otros métodos de transformación para estas plantas. Actualmente, el método de elección para generar monocotiledóneas transgénicas es el bombardeo de partículas (partículas microscópicas de oro o tungsteno recubiertas con el ADN transformante) de callos embriogénicos o embriones en desarrollo (Christou, 1992, Plant J. 2: 275-281; Shimamoto, 1994, Curr. Opin. Biotechnol. 5: 158-162; Vasil et al., 1992, Bio/Technology 10: 667-674). Un método alternativo para la transformación de monocotiledóneas se basa en la transformación de protoplastos como se describe en Omirulleh et al., 1993, Plant Mol. Biol. 21: 415-428. Métodos adicionales de transformación para el uso conforme a la presente descripción incluyen aquellos descritos en las patentes de EE.UU. N.ºs 6,395,966 y 7,151,204 (las cuales que se incorporan en la presente para referencia en su totalidad).

[0239] Después de la transformación, los transformantes que tienen incorporado el constructo de expresión se seleccionan y se regeneran en plantas enteras según métodos bien conocidos en la técnica. Frecuentemente el procedimiento de transformación se diseña para la eliminación selectiva de genes de selección bien durante regeneración o en las siguientes generaciones usando, por ejemplo, cotransformación con dos constructos de T-ADN separados o escisión específica de sitio del gen de selección por una recombinasa específica.

[0240] Además de la transformación directa de un genotipo vegetal particular con un constructo preparado según la presente invención, las plantas transgénicas se pueden preparar 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 mediante cruce, sin la necesidad de transformar directamente una planta de esa variedad dada. Por lo tanto, la presente invención no solo abarca una planta directamente regenerada a partir de células que se han transformado conforme a la presente invención, sino también la progenie de tales plantas. Como se utiliza en la presente, la progenie puede referirse a la descendencia de cualquier generación de una planta progenitora preparada conforme a la presente invención. Tal progenie puede incluir un constructo de ADN preparado conforme a la presente invención o una porción de un constructo de ADN preparado conforme a la presente invención. El cruce resulta en la introducción de un transgen en una línea vegetal por polinización cruzada de una línea de partida con una línea vegetal donante. Ejemplos no limitativos de tales pasos se articulan más a fondo en la patente de EE.UU. N.º: 7,151,204.

[0241] Las plantas se pueden generar a través de un proceso de conversión por retrocruzamiento. Por ejemplo, las plantas incluyen plantas referidas como un genotipo, línea, variedad endogámica o híbrido convertido por retrocruzamiento.

[0242] Se pueden utilizar marcadores genéticos para asistir en la introgresión de uno o más transgenes de la invención desde un fondo genético a otro. La selección asistida por marcadores ofrece ventajas en comparación con el cultivo convencional ya que se puede usar para evitar errores causados por variaciones fenotípicas. Además, los marcadores genéticos pueden proporcionar datos con respecto al grado relativo de germoplasma de élite en la progenie individual de un cruce particular. Por ejemplo, cuando una planta con una característica deseada que, por otra parte, tiene un fondo genético no deseable agronómicamente se cruza con un progenitor de élite, se pueden utilizar marcadores genéticos para seleccionar progenie que no solo posee la característica de interés, sino que también tienen una proporción relativamente grande del germoplasma deseado. De esta manera, se minimiza el número de generaciones requeridas para la introgresión de una o más características en un fondo genético particular.

[0243] La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención que comprenden: (a) el cultivo de una planta o una célula vegetal transgénica que comprende un polinucleótido codificante del polipéptido bajo condiciones que conducen a la producción del polipéptido; y (b) la recuperación del polipéptido.

## Composiciones

[0244] La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden una proteasa de la presente invención. Preferiblemente, las composiciones están enriquecidas en tal proteasa. El término "enriquecido" indica que la actividad de proteasa de la composición se ha aumentado, por ejemplo, con un factor de enriquecimiento de al menos 1,1.

En un aspecto, la composición comprende

un polipéptido aislado que tiene actividad de proteasa, seleccionado del grupo constituido por:

- (a) un polipéptido con al menos un 84% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5;  
 (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos un 84% de identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 1;  
 (c) una variante del polipéptido de SEQ ID N.º: 5 que comprende una sustitución, delección y/o inserción en una o más posiciones, donde el número total de sustituciones, delecciones y/o inserciones aminoacídicas no es superior a 20; y  
 (d) un fragmento de un polipéptido de (a), (b) o (c) que tiene actividad de proteasa,
- 5 en el que el polipéptido tiene actividad de proteasa mejorada a pH entre 3 y 4, a 25°C en comparación con la proteasa NRRL 18262..
- 10 [0245] Una forma de realización de la invención es una composición que comprende un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos un 70% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4.
- 15 [0246] Una forma de realización de la invención es una composición que comprende un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos un 75% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4.
- [0247] Una forma de realización de la invención es una composición que comprende un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos un 80% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4.
- 20 [0248] Una forma de realización de la invención es una composición que comprende un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos un 85% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4.
- [0249] Una forma de realización de la invención es una composición que comprende un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos un 87% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4.
- 25 [0250] Una forma de realización de la invención es una composición que comprende un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos un 90% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4.
- 30 [0251] Una forma de realización de la invención es una composición que comprende un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos un 91% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4.
- [0252] Una forma de realización de la invención es una composición que comprende un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos un 92% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4.
- 35 [0253] Una forma de realización de la invención es una composición que comprende un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos un 93% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4.
- [0254] Una forma de realización de la invención es una composición que comprende un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos un 94% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4.
- 40 [0255] Una forma de realización de la invención es una composición que comprende un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos un 95% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4.
- 45 [0256] Una forma de realización de la invención es una composición que comprende un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos un 96% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4.

[0257] Una forma de realización de la invención es una composición que comprende un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos un 97% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4.

5 [0258] Una forma de realización de la invención es una composición que comprende un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos un 98% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4.

[0259] Una forma de realización de la invención es una composición que comprende un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos un 99% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4.

10 [0260] Una forma de realización de la invención es una composición que comprende un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido con el 100% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4.

15 [0261] En un aspecto, la composición comprende o consiste en la secuencia aminoacídica de SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4 o una variante alélica del mismo; o es un fragmento del mismo que tiene actividad de proteasa. En otro aspecto, la composición comprende o consiste en el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4. En otro aspecto, la composición comprende o consiste en el polipéptido de SEQ ID N.º: 5 o SEQ ID N.º: 6. En otro aspecto, la composición comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 366 de la SEQ ID N.º: 2, aminoácidos 1 a 366 de la SEQ ID N.º: 4, aminoácidos 1 a 366 de la SEQ ID N.º: 5 o aminoácidos 1 a 366 de la SEQ ID N.º: 6.

20 [0262] En una forma de realización, la variante que comprende una sustitución, delección y/o inserción de uno o más (varios) aminoácidos de la SEQ ID N.º: 3 tiene al menos un 60%, por ejemplo, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, 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%, pero menos del 100% de identidad de secuencia con la SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, o el polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 o SEQ ID N.º: 4.

[0263] En una forma de realización preferida, la composición es una composición de pienso para animales que comprende además una o más amilasas, fitasas, xilanasas, galactanasas, alfa-galactosidasas, proteasas, fosfolipasas, beta-glucanasas o cualquier mezcla de las mismas.

30 [0264] En otra forma de realización preferida, la composición es un aditivo para piensos para animales que comprende, además, al menos una vitamina liposoluble, y/o al menos una vitamina hidrosoluble, y/o al menos un oligoelemento. El aditivo para piensos para animales puede comprender además una o más amilasas, fitasas, xilanasas, galactanasas, alfa-galactosidasas, proteasas, fosfolipasas, beta-glucanasas, o cualquier mezcla de las mismas.

35 [0265] La composición puede comprender una proteasa de la presente invención como el componente enzimático principal, por ejemplo, una composición monocomponente. Alternativamente, la composición puede comprender actividades enzimáticas múltiples, tales como una aminopeptidasa, amilasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celulasa, quitinasa, cutinasa, ciclodextrina glicosiltransferasa, desoxirribonucleasa, esterasa, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, glucoamilasa, alfa-glucosidasa, beta-glucosidasa, haloperoxidasa, invertasa, lacasa, lipasa, mannosidasa, oxidasa, enzima pectinolítica, peptidoglucaminasa, 40 peroxidasa, fitasa, polifenoloxidasa, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa o xilanasas. La(s) enzima(s) adicional(es) puede(n) estar producida(s), por ejemplo, por microorganismos tales como bacterias u hongos o por plantas o por animales. Las composiciones se pueden preparar conforme a métodos conocidos en la técnica y pueden estar en forma de un líquido o una composición seca. Por ejemplo, la composición puede estar en forma de un granulado o un microgranulado. La proteasa se puede estabilizar conforme a métodos 45 conocidos en la técnica.

## Usos

[0266] La presente invención se dirige también a métodos para utilizar los polipéptidos con actividad de proteasa, o composiciones de los mismos, por ejemplo, en piensos para animales.

## Uso en piensos para animales

[0267] La presente invención se dirige también a métodos para utilizar las proteasas con actividad de proteasa en piensos para animales, así como en composiciones de pienso y aditivos para piensos que comprenden las proteasas de la invención.

5 [0268] El término animal incluye todos los animales. Ejemplos de animales son no rumiantes y rumiantes. Los animales rumiantes incluyen, por ejemplo, animales tales como ovejas, cabras y ganado, por ejemplo, ganado bovino, vacas y terneros jóvenes. En una forma de realización particular, el animal es un animal no rumiante. Los animales no rumiantes incluyen animales monogástricos, por ejemplo, cerdos o puercos (incluyendo, pero de forma no limitativa, lechones, cerdos en crecimiento y cerdas); aves tales como pavos, patos y pollo (incluyendo, pero de forma no limitativa, pollos de engorde, ponedoras); caballos (incluyendo, pero de forma no limitativa, de sangre caliente, de sangre fría y de sangre tibia), terneros jóvenes; y pescados (incluyendo, pero de forma no limitativa, salmón, trucha, tilapia, siluro y carpas; y crustáceos (incluyendo, pero de forma no limitativa, langostinos y gambas).

[0269] El término pienso o composición de pienso se refiere a cualquier compuesto, preparación, mezcla o composición adecuada para, o destinada para la ingesta por un animal.

15 [0270] En el uso según la invención, se puede suministrar la proteasa al animal antes, después o simultáneamente con la dieta. Se prefiere lo último.

[0271] En una forma de realización particular, la proteasa, en la forma en que se añade al pienso, o cuando se incluye en un aditivo de pienso, está bien definida. Bien definida significa que la preparación de proteasa es al menos un 50% pura como se determina por cromatografía de exclusión de tamaño (véase el ejemplo 12 de WO 01/58275). En otras formas de realización particulares, la preparación de proteasa es al menos un 60, 70, 80, 85, 88, 90, 92, 94 o al menos un 95% pura como se determina por este método.

25 [0272] Una preparación de proteasa bien definida es ventajosa. 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 obtener resultados consistentes y constantes, y la capacidad de optimizar la dosificación en función del efecto deseado.

[0273] Para el uso en piensos para animales, sin embargo, la proteasa no necesita ser tan pura; puede, por ejemplo, incluir otras enzimas, en cuyo caso podría denominarse una preparación de proteasa.

30 [0274] La preparación de proteasa puede ser (a) añadida directamente al pienso (o usada directamente en un proceso de tratamiento de proteínas), o (b) se puede usar en la producción de una o más composiciones intermedias tales como aditivos para piensos o premezclas que se añaden posteriormente al pienso (o se usan en un proceso de tratamiento). El grado de pureza anteriormente descrito se refiere a la pureza de la preparación de proteasa original, independientemente de que se utilice según las opciones anteriores (a) o (b).

35 [0275] Las preparaciones de proteasa con purezas de este orden de magnitud son obtenibles en particular usando métodos recombinantes de producción, mientras que no se obtienen tan fácilmente y además están sujetas a una variación entre lotes mucho más alta cuando la proteasa se produce por métodos tradicionales de fermentación.

[0276] Tal preparación de proteasa puede, por supuesto, mezclarse con otras enzimas.

[0277] La proteína puede ser una proteína animal, tal como harina de carne y huesos, harina de plumas y/o harina de pescado; o puede ser una proteína vegetal.

40 [0278] El término proteínas vegetales como se utiliza en la presente se refiere a cualquier compuesto, composición, preparación o mezcla que incluye al menos una proteína derivada de u originada en un vegetal, incluyendo proteínas modificadas y derivados de proteínas. En formas de realización particulares, el contenido proteico de las proteínas vegetales es de al menos un 10, 20, 30, 40, 50 o 60% (p/p).

45 [0279] Las proteínas vegetales se pueden derivar de fuentes de proteína vegetal, tales como leguminosas y cereales, por ejemplo, materiales de plantas de las familias *Fabaceae* (*Leguminosae*), *Cruciferaeae*, *Chenopodiaceae* y *Poaceae*, tales como harina de soja, harina de altramuza y harina de colza.

[0280] En una forma de realización particular, la fuente de proteína vegetal es material de una o más plantas de la familia *Fabaceae*, por ejemplo, soja, altramuza, guisante o judía.



[0281] En otra forma de realización particular, la fuente de proteína vegetal es material de una o más plantas de la familia *Chenopodiaceae*, por ejemplo, remolacha, remolacha azucarera, espinaca o quinoa.

[0282] Otros ejemplos de fuentes de proteína vegetal son la colza, semilla de girasol, semilla de algodón y col.

[0283] La soja es una fuente preferida de proteína vegetal.

- 5 [0284] Otros ejemplos de fuentes de proteína vegetal son cereales tales como la cebada, el trigo, el centeno, la avena, el maíz, el arroz, el triticale y el sorgo.

[0285] En una forma de realización particular de un proceso de tratamiento, la(s) proteasa(s) en cuestión afecta (o actúa sobre, o ejerce su influencia hidrolítica o de degradación sobre) las proteínas, tales como proteínas vegetales o fuentes de proteína. Para conseguir esto, la proteína o fuente de proteína se suspende típicamente en un solvente, por ejemplo, un solvente acuoso tal como agua, y los valores de pH y de temperatura se ajustan teniendo la debida consideración hacia las características de la enzima en cuestión. Por ejemplo, el tratamiento puede ocurrir a un valor de pH en el que la actividad de la proteasa real es de al menos un 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o al menos un 90%. Asimismo, por ejemplo, el tratamiento puede ocurrir a una temperatura a la que la actividad de la proteasa real es de al menos un 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o al menos un 90%. Las indicaciones anteriores de porcentaje de actividad son relativas a las actividades máximas. La reacción enzimática continúa hasta que se consigue el resultado deseado, después de lo cual se puede detener o no inactivando la enzima, por ejemplo, con un paso de tratamiento térmico.

[0286] En otra forma de realización particular de un proceso de tratamiento de la invención, la acción de la proteasa se sostiene, lo que significa, por ejemplo, que la proteasa se añade a las proteínas, pero su influencia hidrolítica no se acciona, por así decirlo, hasta más tarde cuando se desea, una vez se han establecido las condiciones de hidrolización adecuadas, o una vez se han inactivado cualesquiera inhibidores enzimáticos, o cualquier otro medio que se haya aplicado para posponer la acción de la enzima.

[0287] En una forma de realización, el tratamiento es un pretratamiento de piensos para animales o proteínas para el uso en piensos para animales, es decir, las proteínas se hidrolizan antes de la ingesta.

25 [0288] El término mejora del valor nutricional de un pienso para animales, se refiere a la mejora de la disponibilidad de nutrientes en el pienso. En esta invención, la mejora de los valores nutricionales se refiere en particular a mejorar la disponibilidad de la fracción proteica del pienso, llevando así a la extracción aumentada de proteínas, mayores rendimientos de proteína y/o utilización mejorada de proteínas. Cuando se aumenta el valor nutricional del pienso, aumenta la digestibilidad de proteínas y/o aminoácidos y puede mejorar el índice de crecimiento y/o aumento de peso y/o conversión de pienso (es decir, el peso de pienso ingerido en relación al aumento de peso) del animal.

[0289] La proteasa se puede añadir al pienso en cualquier forma, ya sea como una proteasa relativamente pura o mezclada con otros componentes destinados a la adición en piensos para animales, es decir, en forma de aditivos para piensos para animales, tales como las denominadas premezclas para piensos para animales.

35 [0290] En otro aspecto, la presente invención se refiere a composiciones para el uso en piensos para animales, tales como piensos para animales, y aditivos para piensos para animales, por ejemplo, premezclas.

[0291] Aparte de la proteasa de la invención, los aditivos para 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.

40 [0292] Otros ingredientes opcionales de aditivos para piensos son los agentes colorantes, por ejemplo, carotenoides tales como el beta-caroteno, la astaxantina y la luteína; estabilizadores; aditivos de mejora de crecimiento y compuestos aromáticos/saborizantes, por ejemplo, creosol, anetol, deca-, undeca- y/o dodecalactonas, iononas, irona, gingerol, piperidina, ftalida de propilideno, ftalida de butilideno, capsaicina y/o tanino; péptidos antimicrobianos; ácidos grasos poliinsaturados (AGPI); especies generadoras de oxígeno reactivo; también, se puede utilizar un soporte que puede contener, por ejemplo, 40- 50% en peso de fibras de madera, 8-10% en peso de estearina, 4-5% en peso de polvo de cúrcuma, 4-58% en peso de polvo de romero, 22- 28% en peso de 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.

50 [0293] Un pienso o un aditivo para piensos de la invención también puede comprender al menos otra enzima seleccionada de entre fitasa (EC 3.1.3.8 o 3.1.3.26); xilanas (EC 3.2.1.8); galactanas (EC 3.2.1.89); alfa-

galactosidasa (EC 3.2.1.22); proteasa adicional (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) lisozima (EC 3.2.1.17); y/o beta-glucanasa (EC 3.2.1.4 o EC 3.2.1.6).

5 [0294] En una forma de realización particular, el pienso o un aditivo para piensos de la invención también comprende una fitasa (EC 3.1.3.8 o 3.1.3.26).

[0295] En una forma de realización particular, el pienso o un aditivo para piensos de la invención también comprende una xilanas (EC 3.2.1.8).

10 [0296] Un pienso o un aditivo para piensos de la invención también puede comprender al menos un probiótico o producto microbiano para alimentación directa (DFM) opcionalmente junto con una o más enzimas diferentes seleccionadas de entre fitasa (EC 3.1.3.8 o 3.1.3.26); xilanas (EC 3.2.1.8); galactanasa (EC 3.2.1.89); alfa-galactosidasa (EC 3.2.1.22); proteasa adicional (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).

15 [0297] El producto microbiano para alimentación directa puede ser una bacteria de uno o más de los siguientes géneros: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* y *Megasphaera* o cualquier combinación de los mismos, preferiblemente de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus spp.*, y *Pediococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus acidophilus*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Propionibacterium thoenii*,  
20 *Lactobacillus farciminus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Clostridium butyricum*, *Bifidobacterium animalis ssp. animalis*, *Lactobacillus reuteri*, *Bacillus cereus*, *Lactobacillus salivarius ssp. salivarius*, *Megasphaera elsdenii*, *Propionibacteria sp* y más preferiblemente de las cepas de *Bacillus subtilis* 3A-P4 (PTA-6506); 15A-P4 (PTA-6507); 22C-P1 (PTA-6508); 2084 (NRRL B-500130); LSSA01 (NRRL-B-50104); BS27 (NRRL B-501 05); BS 18 (NRRL B-50633); y BS 278 (NRRL B-50634).

25 [0298] En una forma de realización particular estas otras enzimas están bien definidas (como se ha definido anteriormente para preparaciones de proteasa).

[0299] Ejemplos de péptidos antimicrobianos (PAM) son CAP18, leucocina A, tritripticina, protegrina-1, tanatina, defensina, lactoferrina, lactoferricina y ovispirina tal como novispirina (Robert Lehrer, 2000), plectasinas y  
30 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 actividad antimicrobiana.

[0300] 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, como se describe en WO 94/01459 y WO 02/090384.

35 [0301] Ejemplos de ácidos grasos poliinsaturados son ácidos grasos C18, C20 y C22 poliinsaturados, tales como el ácido araquidónico, ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentanoico y ácido gammalinolénico.

[0302] Ejemplos de especies generadoras de oxígeno reactivo son productos químicos tales como perborato, persulfato o percarbonato; y enzimas tales como una oxidasa, una oxigenasa o una sintetasa.

40 [0303] Por lo general, vitaminas lipo- e hidrosolubles, así como oligoelementos forman parte de lo que se denomina una premezcla destinada a la adición al pienso, mientras que los macrominerales se añaden normalmente por separado al pienso. Cualquiera de estos tipos de composición, cuando se enriquecen con una proteasa de la invención, es un aditivo para piensos para animales de la invención.

45 [0304] En una forma de realización particular, el aditivo para piensos para animales de la invención está destinado a ser incluido (o prescrito como que debe incluirse) en dietas o piensos para animales en cantidades de 0,01 a 10,0%; más particularmente de 0,05 a 5,0%; o de 0,2 a 1,0% (% se refiere a g de aditivo por 100 g de pienso). Esto es así en particular para las premezclas.

[0305] 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, por ejemplo, la vitamina K3.

[0306] 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, por ejemplo, el Ca-D-pantotenato.

[0307] Ejemplos de oligoelementos son manganeso, zinc, hierro, cobre, yodo, selenio y cobalto.

[0308] Ejemplos de macrominerales son calcio, fósforo y sodio.

- 5 [0309] Los requisitos nutricionales de estos componentes (ejemplificados con aves y lechones/cerdos) se enumeran en la tabla A de WO 01/58275. El requisito nutricional se refiere a que estos componentes deberían ser proporcionados en la dieta en las concentraciones indicadas.

- 10 [0310] En la alternativa, el aditivo para 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 se refiere cualquiera de 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.

- 15 [0311] En una forma de realización adicional más, el aditivo para piensos para animales de la invención comprende al menos una de las vitaminas siguientes, preferiblemente para proporcionar una concentración en pienso dentro de los intervalos especificados en la tabla 1 siguiente (para dietas para lechones y dietas para pollos de engorde, respectivamente).

Tabla 1: Recomendaciones típicas de vitaminas

Vitamina	Dieta de lechón	Dieta de pollo de engorde
Vitamina A	10.000-15.000 IU/kg de pienso	8-12.500 IU/kg de pienso
Vitamina D3	1800-2000 IU/kg de pienso	3000-5000 IU/kg de pienso
Vitamina E	60-100 mg/kg de pienso	150-240 mg/kg de pienso
Vitamina K3	2-4 mg/kg de pienso	2-4 mg/kg de pienso
Vitamina B1	2-4 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	0,03-0,05 mg/kg de pienso	0,015-0,04 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	0,15-0,4 mg/kg de pienso	0,15-0,3 mg/kg de pienso
Cloruro de colina	200-400 mg/kg de pienso	300-600 mg/kg de pienso

- 20 [0312] La presente invención también se refiere a composiciones de piensos para animales. Las composiciones de piensos o dietas para animales tienen un contenido relativamente alto de proteína. Las dietas para aves y para cerdos se pueden caracterizar como se indica en la tabla B de WO 01/58275, columnas 2-3. Las dietas para pescado se pueden caracterizar como se indica en la columna 4 de esta tabla B. Además, tales dietas para pescado tienen normalmente un contenido de grasa bruta de 200-310 g/kg.

[0313] WO 01/58275 corresponde a US 09/779334 que se incorpora en la presente para referencia.

- 25 [0314] Una composición de pienso para animales según la invención tiene un contenido de proteína bruta de 50-800 g/kg y comprende además al menos una proteasa como se reivindica en la presente.

- 30 [0315] Además, o en la alternativa (al contenido de proteína bruta indicado arriba), la composición de pienso para animales de la invención tiene un contenido de energía metabolizable de 10-30 MJ/kg; y/o un contenido de calcio de 0,1-200 g/kg; y/o un contenido de fósforo disponible de 0,1-200 g/kg; y/o un contenido de metionina de 0,1-100 g/kg; y/o un contenido de metionina más cisteína de 0,1-150 g/kg; y/o un contenido de lisina de 0,5-50 g/kg.

[0316] En 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 intervalos 2, 3, 4 o 5 de la tabla B de WO 01/58275 (R. 2-5).

5 [0317] 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 por el método de Kjeldahl (A.O.A.C., 1984, Official Methods of Analysis 14ª ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington DC).

10 [0318] La energía metabolizable se puede calcular basándose en la publicación del NRC Nutrient requirements in swine, ninth revised edition 1988, subcommittee on swine nutrition, committee on animal nutrition, board of agriculture, national research council. National Academy Press, Washington, D.C., 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.

15 [0319] El contenido dietético de calcio, fósforo disponible y aminoácidos en dietas para animales completas se calcula basándose en tablas de alimentación tales como Veevoedertabel 1997, gegevens over chemische samenstelling, verteerbaarheid en voederwaarde van voedermiddelen, Central Veevoederbureau, Runderweg 6, 8219 pk Lelystad. ISBN 90-72839-13-7.

[0320] En una forma de realización particular, la composición de pienso para animales de la invención contiene al menos una proteína vegetal tal como se ha definido anteriormente.

20 [0321] 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 de 0-25%. La composición de pienso para animales de la invención también puede comprender granos secos de destilería con solubles (DDGS), típicamente en cantidades de 0-30%.

25 [0322] En otras formas de realización particulares adicionales, la composición de pienso para animales de la invención contiene 0-80% de maíz; y/o 0-80% de sorgo; y/o 0-70% de trigo; y/o 0-70% de cebada; y/o 0-30% de avena; y/o 0-40% de harina de soja; y/o 0-25% de harina de pescado; y/o 0-25% de harina de carne y huesos; y/o 0-20% de suero de leche.

30 [0323] Las dietas para animales pueden, por ejemplo, fabricarse como pienso triturado (no granulado) o pienso granulado. Típicamente, se mezclan los piensos molidos y cantidades suficientes de vitaminas esenciales y se añaden minerales según las especificaciones para la especie en cuestión. Las enzimas se pueden añadir como formulaciones enzimáticas sólidas o líquidas. Por ejemplo, para el pienso triturado se puede añadir una formulación enzimática sólida o líquida antes o durante el paso de mezcla de ingredientes. Para pienso granulado la preparación (líquida o sólida) de proteasa/enzima también se puede añadir antes o durante el paso de alimentación de ingredientes. Típicamente una preparación líquida de proteasa/enzima se añade después del paso de granulación. La enzima también se puede incorporar en un aditivo para piensos o premezcla.

35 [0324] La concentración enzimática final 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.

40 [0325] La proteasa debe aplicarse, por supuesto, en una cantidad efectiva, es decir, en una cantidad adecuada para mejorar la hidrólisis, la digestibilidad y/o mejorar el valor nutricional del pienso. Actualmente, se contempla que la enzima se administre en una o más de las siguientes cantidades (intervalos de dosificación): 0,01-200; 0,01-100; 0,5-100; 1-50; 5-100; 10-100; 0,05-50; o 0,10-10 - todos estos intervalos están en mg de proteína proteasa por kg de pienso (ppm).

45 [0326] Para la determinación de mg de proteína proteasa por kg de pienso, la proteasa se purifica a partir de la composición de pienso, y la actividad específica de la proteasa purificada se determina usando un ensayo relevante (véase en actividad de proteasa, sustratos y ensayos). La actividad de proteasa de la composición de pienso como tal también se determina usando el mismo ensayo, y basándose en estas dos determinaciones, se calcula la dosificación en mg de proteína proteasa por kg de pienso.

50 [0327] Los mismos principios se aplican para la determinación de mg de proteína proteasa en aditivos para piensos. Por supuesto, si una muestra de la proteasa usada está disponible para la preparación del aditivo para piensos o el pienso, la actividad específica se determina a partir de esta muestra (no es necesario purificar la proteasa de la composición de pienso o el aditivo).

**Constructos de ácido nucleico, vectores de expresión, células huésped recombinantes y métodos para la producción de proteasas**

[0328] La presente invención también se refiere a constructos de ácido nucleico, vectores de expresión y células huésped recombinantes que comprenden tales polinucleótidos codificantes de las proteasas de la invención.

- 5 [0329] La presente invención también se refiere a métodos de producción de una proteasa, que comprenden: (a) el cultivo de una célula huésped recombinante que comprende tal polinucleótido; y (b) la recuperación de la proteína.

- 10 [0330] La proteína puede ser nativa o heteróloga a una célula huésped. No se pretende en la presente que el término "proteína" haga referencia a una longitud específica del producto codificado y, por lo tanto, abarca péptidos, oligopéptidos y proteínas. El término "proteína" también abarca dos o más polipéptidos combinados para formar el producto codificado. Las proteínas también incluyen polipéptidos híbridos y polipéptidos fusionados.

[0331] Preferiblemente, la proteína es una proteasa. Por ejemplo, la proteína puede ser una hidrolasa, tal como una enzima proteolítica o proteasa.

- 15 [0332] El gen se puede obtener de cualquier fuente procariótica, eucariota o de otro tipo.

[0333] La presente invención se describe más detalladamente con los ejemplos siguientes que no deberían interpretarse como limitativos del alcance de la invención.

**EJEMPLOS**

**Materiales y métodos**

20 **Medios**

[0334] El medio DAP4C-1 estaba compuesto por 0,5 g de extracto de levadura, 10 g de maltosa, 20 g de dextrosa, 11 g de sulfato de magnesio heptahidratado, 1 g de fosfato dipotásico, 2 g ácido cítrico monohidratado, 5,2 g de fosfato de potasio tribásico monohidratado, 1 ml de Dowfax 63N10 (sustancia antiespumante), 2,5 g de carbonato cálcico, suplementado con 1 ml de disolución de metales KU6, y agua desionizada hasta 1000 ml.

- 25 [0335] La disolución de metales KU6 estaba compuesta por 6,8 g de  $ZnCl_2$ , 2,5 g de  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 0,13 g  $NiCl_2$ , 13,9 g de  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 8,45 g de  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , 3 g de  $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ , y agua desionizada hasta 1000 ml.

[0336] Las placas LB estaban compuestas por 10 g de Bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de cloruro sódico, 15 g de Bacto-agar y agua desionizada hasta 1000 ml.

- 30 [0337] El medio LB estaba compuesto por 10 g de Bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de cloruro sódico, y agua desionizada hasta 1000 ml.

[0338] Las placas COVE-Sacarosa-T estaban compuestas por 342 g de sacarosa, 20 g de polvo de agar, 20 ml de solución salina COVE y agua desionizada hasta 1000 ml. El medio fue esterilizado por autoclave a 15 psi durante 15 minutos (Bacteriological Analytical Manual, 8ª edición, Revisión A, 1998). El medio se enfrió a 60°C y se añadió 10 mM de acetamida, Tritón X-100 (50 µl/500 ml).

- 35 [0339] Los tubos COVE-N-Agar estaban compuestos por 218 g de sorbitol, 10 g de dextrosa, 2,02 g de  $KNO_3$ , 25 g de agar, 50 ml de solución salina Cove y agua desionizada hasta 1000 ml.

[0340] La solución salina COVE estaba compuesta por 26 g de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 26 g de KCl, 26 g de  $KH_2PO_4$ , 50 ml de solución de metales traza COVE y agua desionizada hasta 1000 ml.

- 40 [0341] La solución de metales traza COVE estaba compuesto por 0,04 g de  $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ , 0,4 g de  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 1,2 g de  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,7 g de  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , 0,8 g de  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ , 10 g de  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  y agua desionizada hasta 1000 ml.

## Ensayos de proteasa

### Ensayo cinético Suc-AAPF-pNA:

[0342]

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

- 5 [0343] Se mezclaron 20 µl de muestra de proteasa (diluida en 0,01% de Tritón X-100) con 100 µl de tampón de ensayo. El ensayo se comenzó añadiendo 100 µl de sustrato pNA (50 mg disueltos en 1,0 ml de DMSO y diluido adicionalmente 45x con 0,01% de Tritón X-100). El aumento en OD<sub>405</sub> se monitoreó como una medida de la actividad de proteasa.

### Ensayo de punto final Suc-AAPF-pNA:

[0344]

Sustrato pNA: Suc-AAPF-pNA (Bachem L-1400).  
 Temperatura: controlada (temperatura de ensayo).  
 Tampón de ensayo: 100 mM de ácido succínico, 100 mM de HEPES, 100 mM de CHES, 100 mM de CABS, 1 mM de CaCl<sub>2</sub>, 150 mM de KCl, 0,01% de Tritón X-100, pH 4,0

- 10 [0345] 200 µl de sustrato pNA (50 mg disueltos en 1,0 ml de DMSO y diluido adicionalmente 45x con el tampón de ensayo) se pipetearon en un tubo Eppendorf y colocados en hielo. Se añadieron 20 µl de muestra de proteasa (diluida en 0,01% de Tritón X-100). El ensayo se inició transfiriendo el tubo Eppendorf a un termomezclador Eppendorf, que se ajustó a la temperatura de ensayo. El tubo se incubó durante 15 minutos en el termomezclador Eppendorf a su velocidad de agitación máxima (1400 rpm). La incubación se detuvo transfiriendo el tubo de nuevo al baño de hielo y añadiendo 600 µl de 500 mM de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>/NaOH, pH 9,7. El tubo se mezcló y se transfirieron 200 µl de mezcla a una placa de microtitulación, que se leyó a OD<sub>405</sub>. Se incluyó un tampón ciego en el ensayo (en vez de enzima). OD<sub>405</sub> (muestra) - OD<sub>405</sub> (ciego) fue una medida de actividad de proteasa.
- 15

### Ensayo Protazyme AK:

20 [0346]

Sustrato: comprimido Protazyme AK (caseína reticulada y teñida; de Megazyme)  
 Temperatura: controlada (temperatura de ensayo).  
 Tampón de ensayo: 100 mM de ácido succínico, 100 mM de HEPES, 100 mM de CHES, 100 mM de CABS, 1 mM de CaCl<sub>2</sub>, 150 mM de KCl, 0,01% de Tritón X-100, pH 6,5.

- 25 [0347] Un comprimido Protazyme AK se suspendió en 2,0 ml de 0,01% de Tritón X-100 por agitación suave. 500 µl de esta suspensión y 500 µl de tampón de ensayo se dispensaron en un tubo Eppendorf y se colocaron en hielo. Se añadieron 20 µl de muestra de proteasa (diluida en 0,01% de Tritón X-100). El ensayo se inició transfiriendo el tubo Eppendorf para un termomezclador Eppendorf, que se ajustó a la temperatura de ensayo. El tubo se incubó durante 15 minutos en el termomezclador Eppendorf a su velocidad de agitación máxima (1400 rpm). La incubación se detuvo transfiriendo el tubo de nuevo al baño de hielo. Luego el tubo se centrifugó en una centrífuga helada durante unos pocos minutos y se transfirieron 200 µl de sobrenadante a una placa de microtitulación, que se leyó a OD<sub>650</sub>. Se incluyó un tampón ciego en el ensayo (en vez de enzima). OD<sub>650</sub> (muestra) - OD<sub>650</sub> (ciego) fue una medida de actividad de proteasa.

30 Ensayo cinético Suc-AAPX-pNA:

[0348]

Sustratos pNA : Suc-AAPA-pNA (Bachem L-1775)  
 Suc-AAPR-pNA (Bachem L-1720)  
 Suc-AAPD-pNA (Bachem L-1835)  
 Suc-AAPI-pNA (Bachem L-1790)  
 Suc-AAPM-pNA (Bachem L-1395)  
 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)

Temperatura : temperatura ambiente (25°C)

Tampón de ensayo : 100 mM de ácido succínico, 100 mM de HEPES, 100 mM de CHES, 100 mM de CABS, 1 mM de CaCl<sub>2</sub>, 150 mM de KCl, 0,01% de Tritón X-100, pH 4,0 o pH 9,0.

[0349] Se mezclaron 20 µl de proteasa (diluida en 0,01% de Tritón X-100) con 100 µl de tampón de ensayo. El ensayo se comenzó añadiendo 100 µl de sustrato pNA (50 mg disueltos en 1,0 ml DMSO y diluido adicionalmente 45x con 0,01% de Tritón X-100). El aumento en OD<sub>405</sub> se monitoreó como una medida de la actividad de proteasa.

#### Ensayo o-ftaldialdehído (OPA):

[0350] Este ensayo detecta aminas primarias y, por lo tanto, la escisión de enlaces peptídicos por una proteasa se puede medir como la diferencia en la absorbancia entre una muestra tratada con proteasa y una muestra de control. El ensayo se lleva a cabo 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).

[0351] 500 µl de muestra se filtra a través de un filtro de centrífuga 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 25 µl de cada muestra se carga en una placa de microtitulación de 96 pocillos (5 réplicas). Se dispensan 200 µl de reactivo OPA (100 mM de tetraborato de disodio decahidratado, 3,5 mM de dodecilsulfato sódico (SDS), 5,7 mM de ditioneitol (DDT), 6 mM de o-ftaldialdehído) en todos los pocillos, la placa se agita (10 seg, 750 rpm) y absorbancia medida a 340 nm.

#### **Cepa**

[0352] La cepa *Meripilus giganteus* se aisló a partir de un cuerpo fructífero recogido en Dinamarca en 1993 por Novozymes.

[0353] Una cepa interna de *Trametes cf. versicolor* identificada por secuenciación ITS (espaciador transcrito interno) se usó como la fuente del gen de la proteasa de SEQ ID N.º: 15.

[0354] Una segunda cepa de *Trametes versicolor* secuenciada por Genome Canada ([www.fungalgenomics.ca](http://www.fungalgenomics.ca)) se usó para identificar el gen de la proteasa de SEQ ID N.º: 20.

[0355] La cepa de *Escherichia coli* Top-10 comprada a Invitrogen (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.) se usó para propagar los vectores de expresión.

[0356] La cepa de *Aspergillus oryzae* MT3568 se usó para la expresión heteróloga del gen codificante de los polipéptidos que tienen homología con los polipéptidos con actividad de proteasa. *A. oryzae* MT3568 es un derivado génico alterado de *amdS* (acetamidasa) de *Aspergillus oryzae* JaL355 (WO 2002/40694) en el que se restauró la auxotrofia *pyrG* mediante la interrupción del gen de la acetamidasa de *A. oryzae* (*amdS*) con el gen *pyrG*.

#### **Ejemplo 1: expresión recombinante de la proteasa S53 3 de *Meripilus giganteus* (SEQ ID N.º: 3)**

[0357] Para obtener material para probar y caracterizar la proteasa S53 3 de *Meripilus giganteus*, la secuencia de ADN de SEQ ID N.º: 1 se clonó en un vector de expresión de *Aspergillus* y se expresó en *Aspergillus oryzae*.

[0358] El gen de la proteasa S53 3 de *Meripilus giganteus* se subclonó en el vector de expresión de *Aspergillus* pMStr100 (WO 10/009400) mediante la amplificación de la región codificante sin el codón de parada del ADN en la SEQ ID N.º: 1 desde el clon de plásmido de ADNc, pA2PR22, con técnicas de PCR estándares utilizando los cebadores siguientes:

597 TAGGGATCCTCAGATGGTCGCCACCAGCT (SEQ ID N.º: 13)

598 CAGGCCGACCGCGGTGAG (SEQ ID N.º: 14)

[0359] El producto de PCR se restringió con BamHI y se ligó a los sitios BamHI y NruI de pMStr100, dando como resultado una fusión en marco con la secuencia de etiqueta C-terminal RHQHQQH(parada) en el vector de expresión. El gen de la proteasa S53 3 en el constructo de expresión de *Aspergillus* resultante, pMStr121, se secuenció, y se confirmó que la porción codificante de la proteasa de la secuencia concuerda con la secuencia codificante original de SEQ ID N.º: 1. La fusión en marco a la secuencia codificante de la etiqueta se confirmó también, dando como resultado la secuencia en SEQ ID N.º: 3, que codifica la secuencia peptídica en SEQ ID N.º: 4.

[0360] La cepa de *Aspergillus oryzae* BECh2 (WO 00/39322) se transformó con pMStr121 utilizando técnicas estándares como se describe en Christensen et al., 1988, Biotechnology 6,1419-1422 y WO 04/032648. Para identificar los transformantes que producen la proteasa recombinante, se cultivaron los transformantes y BECh2 en 10 ml de medio YP + 2% de glucosa a 30°C y 200 RPM. Las muestras se tomaron después de 3 días de crecimiento y se resolvieron con SDS-PAGE para identificar la producción de proteasa recombinante. Se observó una banda nueva entre 35 y 50 kDa en los cultivos de transformantes que no se observó en cultivos de BECh2 no transformados. Varios transformantes que parecía que expresaban la proteasa recombinante en cantidades altas se cultivaron adicionalmente en 100 ml de medio YP + 2% de glucosa en 500 ml en matraces de agitación a 30°C y 200 RPM. Las muestras se tomaron después de 2, 3 y 4 días de crecimiento y niveles de expresión comparados resolviendo las muestras con SDS-PAGE. Un único transformante que expresó la proteasa recombinante a niveles relativamente altos se seleccionó y se designó EXP01737. EXP01737 se aisló dos veces por dilución de conidias en medio selectivo que contenía 0,01% de TRITON® X-100 para limitar el tamaño de colonia y se fermentó en medio YP + 2% de glucosa en matraces de agitación como se ha descrito anteriormente para proporcionar material para la purificación. Los cultivos de los matraces de agitación se cosecharon después de 4 días de crecimiento y los micelios fúngicos se eliminaron por filtración del caldo de fermentación a través de Miracloth (Calbiochem) y purificados luego como se describe en el ejemplo 2.

#### Medio YP + 2% de glucosa

[0361]

10 g de extracto de levadura  
20 g de peptona  
Agua hasta 1L  
Autoclavar a 121°C, 20 minutos  
Añadir 100 ml de solución estéril de glucosa al 20%

#### **Ejemplo 2: purificación de la proteasa S53 3 de *Meripilus giganteus* con etiqueta HQ C-terminal**

[0362] El caldo de cultivo se centrifugó (20000 x g, 20 min) y el sobrenadante se decantó cuidadosamente del precipitado. El sobrenadante se filtró a través de una unidad de filtración Nalgene de 0,2 µm para eliminar el resto de células huésped de *Aspergillus*. El filtrado de 0,2 µm se transfirió a 10 mM de ácido succínico/NaOH, pH 3,5 en una columna Sefadex G25 (de GE Healthcare). La enzima transferida a Sefadex G25 se aplicó a una columna Q-sefarosa FF (de GE Healthcare) equilibrada en 10 mM de ácido succínico/NaOH, pH 3,5. El producto filtrado y lavado con 10 mM de ácido succínico/NaOH, pH 3,5 se recogió y contenía la proteasa S53 (actividad confirmada utilizando el ensayo cinético Suc-AAPF-pNA a pH 4). El pH de la fracción filtrada y lavada se ajustó a pH 3,25 con 1M de HCl mientras se mezclaba la fracción concienzudamente. La solución ajustada al pH se aplicó a una columna SP-sefarosa FF (de GE Healthcare) equilibrada en 10 mM de ácido succínico/NaOH, pH 3,25. Después de lavar la columna extensivamente con el tampón de equilibrado, la proteasa se eluyó con un gradiente lineal de NaCl (0 --> 0,5 M) en el mismo tampón en diez volúmenes de columna. Las fracciones de la columna se analizaron para determinar la actividad de proteasa (utilizando el ensayo cinético Suc-AAPF-pNA a pH 4) y se agruparon las fracciones pico. El sulfato de amonio sólido se añadió al conjunto a una concentración final de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de 2,0 M. La solución enzimática se aplicó a una columna fenil-Toyopearl (de TosoHaas) equilibrada en 10 mM de ácido succínico/NaOH, 2,0 M de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 3,25. Después de lavar la columna



extensivamente con el tampón de equilibrado, la proteasa S53 se eluyó con un gradiente lineal entre el tampón de equilibrado y 10 mM de ácido succínico/NaOH, pH 3,25 en diez volúmenes de columna. Las fracciones de la columna se analizaron para determinar la actividad de proteasa (utilizando el ensayo cinético Suc-AAPF-pNA a pH 4). Las fracciones con actividad alta se agruparon y transfirieron a 10 mM de ácido succínico/NaOH, pH 3,5 en una columna Sefadex G25 (de GE Healthcare). La proteasa transferida a Sefadex G25 se aplicó a una columna SP-sefarosa HP (de GE Healthcare) equilibrada en 10 mM de ácido succínico/NaOH, pH 3,5. Después de lavar la columna extensivamente 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 que constituyen el pico principal de la columna se agruparon como producto purificado. El producto purificado se analizó por SDS-PAGE y se observó una banda principal en el gel y tres bandas menores. La secuenciación de EDMAN N-terminal de las bandas mostró que todas las bandas estaban relacionadas con la proteasa S53 y, por lo tanto, esperamos que las bandas menores representen el corte de alguna de las moléculas de proteasa S53. El producto purificado se usó para la caracterización adicional.

### Ejemplo 3: caracterización de la proteasa S53 3 de *Meripilus giganteus* con etiqueta HQ C-terminal

[0363] El ensayo cinético Suc-AAPF-pNA se usó para obtener el perfil de actividad en función del pH y el perfil de estabilidad en función del pH (actividad residual tras 2 horas a los valores de pH indicados). Para el perfil de estabilidad en función del pH la proteasa se diluyó 10x en los diferentes tampones de ensayo para alcanzar los valores de pH de estos tampones y luego se incubó durante 2 horas a 37°C. Tras la incubación, el pH de las incubaciones de proteasa se transfirió al mismo valor de pH, antes del ensayo para determinar la actividad residual, por dilución en el tampón de ensayo de pH 4,0. El ensayo de punto final Suc-AAPF-pNA se usó para la obtención del perfil de actividad en función de la temperatura a pH 4,0. El ensayo cinético Suc-AAPX-pNA y diez sustratos Suc-AAPX-pNA diferentes se usaron para la obtención de la especificidad por P1 de la enzima a pH 4,0.

[0364] Los resultados se muestran en las tablas 2-5 a continuación. Los datos para la proteasa 10R se incluyen en las tablas. Para la tabla 2, las actividades son relativas al pH óptimo para las enzimas. Para la tabla 3, las actividades son actividades residuales con respecto a muestras, que se mantuvieron en condiciones estables (5°C, pH 4,0 para la proteasa S53 3 de *Meripilus giganteus* (del ejemplo 2); 5°C, pH 9,0 para la proteasa 10R). Para la tabla 4, las actividades son relativas a la temperatura óptima para la enzima (pH 4,0 para la proteasa S53 3 de *Meripilus giganteus* (del ejemplo 2); pH 6,5 para la proteasa 10R). Para la tabla 5, las actividades son relativas al mejor sustrato para las enzimas (Suc-AAPL-pNA para la proteasa S53 3 de *Meripilus giganteus* (del ejemplo 2)). El ensayo Protazyme AK se usó para la obtención del perfil de temperatura-actividad a pH de 6,5 para la proteasa 10R.

[0365] La actividad en función del pH en el sustrato Suc-AAPF-pNA, el perfil de estabilidad en función del pH (actividad residual tras 2 horas a 37°C), el perfil de actividad en función de la temperatura en Suc-AAPF-pNA a pH 4,0 y la especificidad por P1 en 10 sustratos Suc-AAPF-pNA a pH 4,0 para la proteasa S53 3 de *Meripilus giganteus* (del ejemplo 2) comparada con los datos para la proteasa 10R también se muestran en las figuras 1-4. Para la proteasa 10R, el perfil de actividad en función de la temperatura está en Protazyme AK a pH 6,5 y la especificidad por P1 está a pH 9,0.

Tabla 2: perfil de actividad en función del pH a 25°C como se determina utilizando el ensayo cinético Suc-AAPF-

pNA		
pH	Proteasa S53 3 de <i>Meripilus giganteus</i> (del ejemplo 2)	Proteasa 10R
2	0,38	-
3	0,95	0,00
4	1,00	0,02
5	0,27	0,07
6	0,02	0,21
7	0,00	0,44
8	0,00	0,67
9	0,00	0,88
10	0,00	1,00
11	0,00	0,93

Tabla 3: perfil de estabilidad en función del pH (actividad residual tras 2 horas a 37°C) como se determina utilizando el ensayo cinético Suc-AAPF-pNA

<b>pH</b>	<b>Proteasa S53 3 de <i>Meripilus giganteus</i> (del ejemplo 2)</b>	<b>Proteasa 10R</b>
2	0,01	0,78
3	0,99	1,03
4	0,96	0,99
5	0,94	1,00
6	0,87	1,03
7	0,69	1,01
8	0,01	0,98
9	0,01	0,99
10	0,01	0,99
11	0,01	0,86
Tras 2 horas a 5 °C	1,00 (a pH 4)	1,00 (a pH 9)

5 Tabla 4: perfil de actividad de temperatura a pH 4,0 o pH 6,5 como se determina utilizando el ensayo de punto final Suc-AAPF-pNA

<b>Temp (°C)</b>	<b>Proteasa S53 3 de <i>Meripilus giganteus</i> (del ejemplo 2, pH 4)</b>	<b>Proteasa 10R (pH 6,5)</b>
15	0,07	0,01
25	0,23	0,02
37	0,58	0,06
50	1,00	0,13
60	0,44	0,35
70	0,08	0,96
80	-	1,00
90	-	0,18

Tabla 5: especificidad por P1 en 10 sustratos Suc-AAPX-pNA a pH 4,0 o pH 9,0 a 37°C como se determina utilizando el ensayo cinético Suc-AAPX-pNA

<b>Suc-AAPX-pNA</b>	<b>Proteasa S53 3 de <i>Meripilus giganteus</i> (del ejemplo 2, pH 4)</b>	<b>Proteasa 10R (pH 9)</b>
Suc-AAPA-pNA	0,01	0,13
Suc-AAPR-pNA	0,00	0,09
Suc-AAPD-pNA	0,06	0,00
Suc-AAPI-pNA	0,00	0,00
Suc-AAPM-pNA	0,53	0,78
Suc-AAPV-pNA	0,00	0,01
Suc-AAPL-pNA	1,00	0,18
Suc-AAPE-pNA	0,05	0,00
Suc-AAPK-pNA	0,00	0,08
Suc-AAPF-pNA	0,99	1,00

Otras características para la Proteasa S53 3 de *Meripilus giganteus* (del ejemplo 2)

[0366] La determinación de la secuencia N-terminal fue: AIPASCASTI.

[0367] El peso molecular relativo como se determina por SDS-PAGE fue aprox. Mr = 43 kDa.

Confirmación de etiqueta HQ C-terminal unida a la secuencia madura

5 [0368] Esta muestra fue tampón intercambiado con 50 mM de tampón de acetato sódico pH 5,5 que utiliza una unidad de ultrafiltración Vivaspin equipada con un filtro de corte de 10 kDa. Después del intercambio de tampón, se añadieron 2 µL de endoglicosidasa H y se incubó la muestra luego a 5°C durante toda la noche. Nota: para cada sitio unido a N deglicosilado permanece un residuo N-acetil hexosamina en la cadena principal de la proteína que aumenta el peso molecular con 203,19 Da por sitio. La muestra se analizó luego por espectrometría de masas.

[0369] El peso molecular determinado por análisis de peso molecular intacto del pico principal fue: 38088,6 Da, que corresponde a 1,8 Da de la secuencia madura más -RHQH más una acetilhexosamina única y un residuo de cisteína no reticulado.

15 [0370] El peso molecular determinado por análisis de peso molecular intacto del pico secundario fue: 37961 Da, que se corresponde con 2,3 Da de la secuencia madura más -RHQH más una acetil hexosamina única y un residuo de cisteína no reticulado.

[0371] La secuencia madura (a partir de datos de secuenciación de EDMAN N-terminal y análisis de peso molecular intacto):

AIPASCASTITPACLQAIYGIPTTKATQSSNKLAVSGFIDQFANKADLKSFLAQFRKDISSTTFSLQT  
LDGGENDQSPSEAGIEANLDIQYTVGLATGVPTTFISVGGDDFQDGNLEGFLDIINFLLGESNPPQVL  
TTSYGQNTISAKLANQLCNAYAQLGARGTSILFASGDGGVSGSQAHCNSNFVPTFPSPGCPFMT  
SVGATQGVSPETAAAFSSGGFSNVFGIPSYQASAVSGYLSALGSTNSGKFNRSGRGFPDVSTQG  
VDFQIVSGGQTIGVDGTSCASPTFASVISLVNDRLIAAGKSPLGFLNPFLYSSAGKAALNDVTSGSN  
PGCSTNGFPAKAGWDPVTGLGTPNFAKLLTAVGLRHQH (SEQ ID NO: 6).

20 [0372] El peso molecular calculado de esta secuencia madura es 37882,6 Da.

**Ejemplo 4: ensayo de actividad de harina de maíz y soja**

[0373] Un ensayo de punto final que usa harina de maíz y soja como sustrato se usó para la obtención del perfil de actividad de las proteasas a pH 3-7.

25 Sustrato: harina de soja - harina de maíz mezclado en una proporción de 30:70.  
Tampones de ensayo: se preparon 9 tampones conteniendo 100 mM de ácido succínico, 100 mM de HEPES, 100 mM de CHES, 100 mM de CAPS, 1 mM de CaCl<sub>2</sub>, 150 mM de KCl, 0,01% de Tritón X-100 y ajustados usando HCl o NaOH a un valor de pH tal que después de que se haya mezclado el sustrato de harina de soja-maíz (1 g) con tampón de ensayo (10 mL) para dar una suspensión, el pH final de la suspensión fue uno de los siguientes pH: 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0 y 11,0.

30 [0374] La suspensión de sustrato (2 ml) se mezcló durante 30 min antes de la adición de proteasa e incubada durante 3 horas a 40°C (500 rpm). La proteasa (200 mg de proteína enzimática/kg de sustancia seca) se disolvió en 100 µl de 100 mM de tampón de acetato sódico (9,565 g/L de NaOAc, 1,75 g/L de ácido acético, 5 mM de CaCl<sub>2</sub>, 0,01% de BSA, 0,01% de Tween20, pH 6,0) y añadida. Las muestras se centrifugaron (10 min, 4000 rpm, 0°C) y los sobrenadantes se recogieron para análisis utilizando el ensayo o-ftaldialdehído (OPA).

35 [0375] Los resultados se muestran en la tabla 6 a continuación. La actividad proteolítica de la proteasa S53 3 de *Meripilus giganteus* (del ejemplo 2) en la harina de maíz y soja está en su máximo a pH de 3 y se reduce con pH creciente. A pH 5, la proteasa S53 3 de *Meripilus giganteus* (del ejemplo 2) es tan activa en la harina de maíz y

soja como la proteasa 10R, mientras que a pH 3 y pH 4 la proteasa S53 3 de *Meripilus giganteus* (del ejemplo 2) es mucho más activa que la proteasa 10R. Estos resultados indican que la proteasa S53 3 de *Meripilus giganteus* (del ejemplo 2) podría ser eficaz para obtener hidrólisis de proteína en el tubo digestivo superior de animales monogástricos tales como, por ejemplo, cerdos y aves, conduciendo a la utilización mejorada de proteínas de pienso en estas especies.

Tabla 6: actividad de proteasa (OD<sub>340</sub> x factor de dilución) en harina de maíz y soja a pH de 3,0, 4,0, 5,0, 6,0 y

7,0

pH	Proteasa S53 3 de <i>Meripilus giganteus</i> (del ejemplo 2)		Proteasa 10R	
	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar
3,0	3,02	0,08	0,22	0,06
4,0	1,31	0,06	0,30	0,10
5,0	0,64	0,03	0,71	0,01
6,0	0,19	0,04	1,81	0,14
7,0	0,02	0,04	2,92	0,11

La figura 5 muestra la actividad (OD<sub>340</sub> x factor de dilución) en la harina de maíz y soja de la proteasa S53 3 de *Meripilus giganteus* (del ejemplo 2) en comparación con la proteasa 10R.

#### Ejemplo 5: actividad proteolítica en digestas de buche, molleja e íleon de pollos de engorde

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

Tampón de buche: 100 mM HEPES, 1 mM CaCl<sub>2</sub>·2 H<sub>2</sub>O, 150 mM KCl, 0,01% Tritón X-100, ajustado a pH 5 usando HCl

Tampón de molleja: 100 mM ácido succínico, 1 mM CaCl<sub>2</sub>·2 H<sub>2</sub>O, 150 mM KCl, 0,01% Tritón X-100, ajustado a pH 1,67 usando HCl

Tampón de íleon: 100 mM HEPES, 1 mM CaCl<sub>2</sub>·2 H<sub>2</sub>O, 150 mM KCl, 0,01% Tritón X-100, ajustado a pH 7,2 usando HCl

[0377] El pH resultante fue: pH 5 en las muestras de buche; pH 3 en las muestras de molleja; y pH 7 en las muestras de íleon. Las suspensiones se calentaron a 40°C y se dispensó 1 ml en tubos mantenidos a 40°C. Tres tubos representando el blanco (T<sub>0</sub>) se centrifugaron inmediatamente (3000 x g, 0°C, 10 min) y los sobrenadantes se congelaron. O la enzima (200 mg de proteína enzimática/kg de sustrato) en 50 µL de 100 mM tampón de acetato sódico (9,565 g/l NaOAc, 1,75 g/l ácido acético, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,01% BSA, 0,01% Tween20, pH 6,0) o solo tampón de acetato sódico (50 µL) para las muestras blanco se añadió a los tubos y muestras de buche e íleon se incubaron durante 3 horas (T<sub>3</sub>) mientras que las muestras de molleja se incubaron durante 1 hora (T<sub>1</sub>) a 40°C en agitación (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 mediante análisis de aminas primarias utilizando el ensayo 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 en la muestra blanco T<sub>0</sub> y las muestras blanco se incubaron durante 1 o 3 horas. Esta diferencia se puede asignar a la actividad de proteasas presente en el sustrato y originada de las materias primas de la dieta o el animal. Durante la incubación de las digestas de buche y de molleja, la proteasa S53 3 de *Meripilus giganteus* (del ejemplo 2) aumentó adicionalmente el nivel de aminas primarias en comparación con la muestra blanco, que demuestra que la proteasa tenía una actividad proteolítica en este sustrato bajo las condiciones dadas. La proteasa S53 3 de *Meripilus giganteus* (del ejemplo 2) funcionó significativamente mejor durante la incubación de buche y molleja que la proteasa 10R, indicación de que la proteasa S53 3 de *Meripilus giganteus* (del ejemplo 2) podría ser más eficaz para la hidrólisis de proteínas de pienso en el tubo digestivo superior de aves, conduciendo a una digestibilidad de proteína mejorada. Como se esperaba, la proteasa S53 3 de *Meripilus giganteus* (del ejemplo 2) no aumentó significativamente el nivel de aminas libres durante la incubación de íleon a pH 7.

Tabla 7: actividad proteolítica de la proteasa S53 3 de *Meripilus giganteus* (del ejemplo 2) en comparación con la proteasa 10R cuando se incubó con digesta de pollos de engorde y expresada como nivel de aminas primarias medido por el ensayo OPA ( $OD_{340} \times$  factor de dilución)

Tratamiento	Buche (3 horas)	Molleja (1 hora)	Íleon (3 horas)
Blanco ( $T_0$ )	$2,21 \pm 0,02^d$	$2,95 \pm 0,02^c$	$9,37 \pm 0,08^c$
Blanco	$3,54 \pm 0,02^c$	$3,94 \pm 0,08^b$	$14,40 \pm 0,66^{ab}$
Proteasa S53 3 de <i>Meripilus giganteus</i> (del ejemplo 2)	$4,13 \pm 0,03^a$	$4,37 \pm 0,05^a$	$14,20 \pm 0,19^{ab}$
Proteasa 10R	$3,85 \pm 0,07^b$	$3,87 \pm 0,21^b$	$14,74 \pm 0,15^a$

<sup>a,b,c</sup>Los valores dentro de una columna que no están conectados por las mismas letras en superíndice son diferentes estadísticamente como se determina por el test de Tukey Kramer ( $\alpha = 0,05$ ) proporcionadas por el procedimiento ANOVA (SAS Institute Inc.).

- 5 [0379] La figura 6 muestra el nivel de aminas libres ( $OD_{340} \times$  factor de dilución) en muestras blanco  $T_0$ , muestras blanco y muestras incubadas con la proteasa S53 3 de *Meripilus giganteus* (del ejemplo 2) o la proteasa 10R. El sustrato para la incubación fue material de digestas del buche, molleja o íleon de pollos de engorde.

#### Ejemplo 6: termoestabilidad

- 10 [0380] Una alícuota de la muestra de proteína de proteasa (purificada como se describe en el ejemplo 2 o 12) o bien se desala o se cambia de tampón en 20 mM de acetato de Na, pH 4,0 utilizando una columna PD-10 preempaquetada o bien se dializa contra 2 x 500 ml 20 mM de acetato de Na, pH 4,0 a 4°C en un paso de 2-3h seguido de un paso durante toda la noche. La muestra se filtra a 0,45  $\mu$ m y se diluye con tampón hasta aprox. 2 unidades A280. El tampón de diálisis se usa como referencia en la calorimetría diferencial de barrido (DSC). Las muestras se desgasifican usando aspiración al vacío y agitación durante aprox. 10 minutos.

- 15 [0381] Se realiza un barrido DSC en un calorímetro VP-DSC de MicroCal a una velocidad de barrido constante de 1,5 °C/min de 20-90 °C. El manejo de datos se realiza utilizando el software Origin de MicroCal (versión 4.10), y la temperatura de desnaturalización,  $T_d$  (también llamada temperatura de fusión,  $T_m$ ) se define como la temperatura en el ápice del pico en el termograma.

#### Ejemplo 7: estabilidad de vapor

- 20 [0382] La actividad residual de la proteasa después de tratar con vapor se puede evaluar utilizando el ensayo siguiente.

- 25 [0383] En estos experimentos se usa una configuración modificada con la cual se proporciona el vapor a partir de un generador de vapor y llevado a la caja. Las muestras colocadas en una placa se insertan en la caja a través de un cajón cuando la temperatura ha alcanzado aprox. 93-94°C. Tras la inserción de las muestras la temperatura cae a 4 °C. La incubación se realiza durante 30 segundos mientras la temperatura permanece aproximadamente constante a 90°C. Luego la placa se retira rápidamente desde la caja, las muestras se colocan en hielo, se resuspenden y se evalúan respecto a la actividad de proteasa usando, por ejemplo, el ensayo 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

- 30 [0384] La granulación enzimática se realiza de una manera como se describe en la patente de EE.UU. n.º 4,106,991, ejemplo 1. El granulado obtenido se seca en un lecho fluido hasta un contenido de agua inferior a un 1% y se tamiza para obtener un producto con el intervalo de partícula de 250  $\mu$ m a 850  $\mu$ m. Finalmente, el producto se recubre con aceite de palma y carbonato cálcico de la manera como se describe en la patente de EE.UU. N.º. 4,106,991, ejemplo 22.

- 35 [0385] Aproximadamente 50 g de granulado enzimático se premezcla con 10 kg de pienso durante 10 minutos en un mezclador horizontal pequeño. Esta premezcla se mezcla con 90 kg de pienso durante 10 minutos en un mezclador horizontal mayor. Desde el mezclador, el pienso se lleva al acondicionador (un mezclador de cascada

con inyección de vapor) a una velocidad de aproximadamente 300 kg/hora. El acondicionador calienta el pienso a 95°C (medido en la salida) por vapor de inyección. El periodo de permanencia en el acondicionador es de 30 segundos. Desde el acondicionador, el pienso se lleva a una prensa Simon Heesen equipada con un troquel horizontal de 3,0x35 mm y se prensa en gránulos con una longitud de alrededor de 15 mm. Después de la prensa, los gránulos se colocan en un refrigerador de aire y se enfrían durante 15 minutos.

[0386] La actividad de proteasa se mide utilizando el ensayo Suc-AAPF-pNA antes de la granulación y en los gránulos de pienso después de la granulación. La estabilidad de granulación se determina por comparación de la actividad de proteasa en el pienso granulado respecto a la actividad en el pienso no granulado.

#### **Ejemplo 9: clonación de dos genes de proteasa de *Trametes cf. versicolor* y *Trametes versicolor***

[0387] Basándose en las secuencias de gen identificadas, la SEQ ID N.º: 15 de una cepa de *Trametes cf. versicolor* (véase la sección de cepa) y la SEQ ID N.º: 20 de una cepa de *Trametes versicolor* (véase la sección de cepa) se diseñaron dos secuencias de ADN codificantes (CDS) sintéticas con optimización de codón para la expresión en *Aspergillus oryzae* (SEQ ID N.º: 17 y SEQ ID N.º: 22, respectivamente). Esas dos secuencias CDS se sintetizaron por GeneArt® (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.) en un vector pMA-T en una escala de 5 µg con dos sitios flanqueantes *Bam*HI en 5' y *Hind*III en 3' compatibles con el vector de expresión pDAu109 (WO 2005042735). 1 µg de esos plásmidos se digirieron posteriormente con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III de NEB (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante, y los fragmentos resultantes se separan por electroforesis en gel de agarosa al 1% usando tampón TAE. El fragmento de 1,7 kb correspondiente a los genes de proteasa sintéticos se escindieron del gel y se purificaron utilizando un kit de GFX® PCR DNA y Gel Band Purification (GE Healthcare, Hillerød, Dinamarca) siguiendo las instrucciones del fabricante. 100 ng de aquellos insertos se clonaron en el vector de expresión pDAu109 (WO 2005042735) previamente digeridos con *Bam*HI e *Hind*III por ligamiento con una ligasa T4 de NEB (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

[0388] Un volumen de 2,5 µl de la mezcla de ligamiento diluida se usó para transformar células de *E. coli* TOP10 competentes químicamente (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.). Se seleccionaron tres colonias de placas de agar LB conteniendo 100 µg de ampicilina por ml para cada constructo y se cultivaron durante toda la noche en 3 ml de medio LB suplementado con 100 µg de ampicilina por ml. El plásmido de ADN se purificó utilizando un kit Qiagen Spin Miniprep (Cat. 27106) (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Las secuencias sintéticas de proteasa de *Trametes cf. versicolor* y *Trametes versicolor* se verificaron por secuenciación de Sanger antes de la expresión heteróloga. Los plásmidos designados como MDQM0673-1 y MDQM0584-1 (reteniendo las CDS SEQ ID N.º: 17 y SEQ ID N.º: 22, respectivamente) se seleccionaron para la transformación de protoplastos y la expresión heteróloga de sus proteasas codificadas en una célula huésped de *Aspergillus oryzae* MT3568 (descritas en el capítulo de cepa).

#### **Ejemplo 10: transformación de *Aspergillus oryzae* con el gen que codifica las proteasas de *Trametes cf. versicolor* y *Trametes versicolor* y selección de los mejores transformantes**

[0389] Los protoplastos de *Aspergillus oryzae* MT3568 (véase capítulo de cepas) se preparon según WO 95/002043. Cien µl de protoplastos se mezclaron con 2,5-10 µg de cualquiera de los vectores de expresión de *Aspergillus* MDQM0673-1 y MDQM0584-1 (ejemplo 9), 250 µl de 60% de PEG 4000 (Applichem, Darmstadt, Alemania) (polietilenoglicol, peso molecular 4.000), 10 mM de CaCl<sub>2</sub> y 10 mM de Tris-HCl pH 7,5 y se mezclaron suavemente. La mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos y los protoplastos se extendieron sobre placas COVE para la selección. Tras la incubación durante 4-7 días a 37°C, las esporas de ocho transformantes se inocularon en 0,5 ml de medio DAP4C-1 suplementado con ácido láctico y con fosfato de diamonio en placas de 96 pocillos profundos. Tras 4 días de cultivo a 30°C, los caldos de cultivo se analizaron por SDS-PAGE usando gel Novex® de tris-glicina al 4-20% (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EE.UU.) para identificar los transformantes que producen la mayor cantidad de proteasa recombinante de *Trametes versicolor*.

[0390] Basándose en la intensidad de banda del gel SDS-PAGE, las esporas del mejor transformante se extendieron en placas COVE-Sacarosa-T conteniendo 0,01% TRITON® X-100 para aislar colonias individuales. La extensión se repitió dos veces en total en placas COVE-Sacarosa-T, y luego una colonia individual se extendió en un tubo COVE-N-Agar hasta la esporulación.

#### **Ejemplo 11: fermentación de *Aspergillus oryzae* transformado con el gen codificante de las proteasas de *Trametes cf. versicolor* y *Trametes versicolor***

[0391] 150 ml de medio DAP4C-1 suplementado con 5 ml de ácido láctico al 20% y 3,5 ml de fosfato de diamonio al 50% y las esporas de los mejores transformantes se cultivaron en matraces de agitación durante 4 días a una

temperatura de 30°C en agitación a 100 rpm. Los caldos de cultivo se cosecharon por filtración utilizando un dispositivo de filtro de 0,2 µm y se usaron para caracterización adicional.

**Ejemplo 12: purificación de la proteasa S53 1 de *Trametes cf versicolor***

[0392] El caldo de cultivo 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 Nalgene de 0,2 µm para eliminar el resto de las células huésped de *Aspergillus*. El filtrado de 0,2 µm se transfirió a 10 mM de ácido succínico/NaOH, pH 3,5 en una columna Sefadex G25 (de GE Healthcare). La enzima transferida a Sefadex G25 se aplicó a una columna SP-sefarosa FF (de GE Healthcare) equilibrada en 10 mM de ácido succínico/NaOH, pH 3,5. Después de lavar la columna extensivamente con el tampón de equilibrado, la proteasa se eluyó con un gradiente lineal de NaCl (0 --> 1,0 M) en el mismo tampón en diez volúmenes de columna. Las fracciones de la columna se analizaron para determinar la actividad de proteasa (utilizando el ensayo cinético Suc-AAPF-pNA a pH 4) y se analizaron fracciones pico por SDS-PAGE. Las fracciones con solo una banda en el gel SDS-PAGE teñido con coomassie se agruparon como el producto purificado. El producto purificado se usó para caracterización adicional.

**Ejemplo 13: caracterización de la proteasa S53 1 de *Trametes cf versicolor* (SEQ ID N.º: 19)**

[0393] El ensayo cinético Suc-AAPF-pNA se usó para obtener el perfil de actividad en función del pH. El ensayo de punto final Suc-AAPF-pNA se usó para obtener el perfil de estabilidad en función del pH (actividad residual tras 2 horas a los valores de pH indicados) y el perfil de temperatura-actividad a pH de 4,0. Para el perfil de estabilidad en función del pH, la proteasa se diluyó 7x en los diferentes tampones de ensayo para alcanzar los valores de pH de estos tampones y luego se incubó durante 2 horas a 37°C. Tras la incubación, el pH de las incubaciones de proteasa se transfirió al mismo valor de pH, antes del ensayo para determinar la actividad residual, por dilución en el tampón de ensayo de pH 4,0. Se usaron el ensayo cinético Suc-AAPX-pNA y diez sustratos Suc-AAPX-pNA diferentes para la obtención de la especificidad por P1 de la enzima a pH 4,0.

[0394] Los resultados se muestran en las tablas 8-11 siguientes. Los datos para la proteasa S53 3 de *Meripilus giganteus* (del ejemplo 2) y la proteasa 10R se incluyen en las tablas. Para la tabla 8, las actividades son relativas al pH óptimo para las enzimas. Para la tabla 9, las actividades son actividades residuales con respecto a muestras, que se mantuvieron en condiciones estables (5°C, pH 4,0). Para la tabla 10, las actividades son relativas a la temperatura óptima a pH 4,0 para la enzima. Para la tabla 11, las actividades son relativas al mejor sustrato para las enzimas (Suc-AAPL-pNA para la proteasa S53 1 de *Trametes cf versicolor*).

**Tabla 8: perfil de actividad-pH a 25°C como se determina utilizando el ensayo cinético Suc-AAPF-pNA**

pH	Proteasa S53 1 de <i>Trametes cf versicolor</i> (del ejemplo 12)	Proteasa S53 3 de <i>Meripilus giganteus</i> (del ejemplo 2)	Proteasa 10R
2	0,00	0,38	-
3	0,75	0,95	0,00
4	1,00	1,00	0,02
5	0,32	0,27	0,07
6	0,02	0,02	0,21
7	0,00	0,00	0,44
8	0,00	0,00	0,67
9	0,00	0,00	0,88
10	0,00	0,00	1,00
11	0,00	0,00	0,93

Tabla 9: perfil de estabilidad-pH (actividad residual tras 2 horas a 37°C) como se determina utilizando el ensayo cinético Suc-AAPF-pNA

pH	Proteasa S53 1 de <i>Trametes cf versicolor</i> (del ejemplo 12)	Proteasa S53 3 de <i>Meripilus giganteus</i> (del ejemplo 2)	Proteasa 10R
2	0,01	0,01	0,78
3	0,31	0,99	1,03
4	0,94	0,96	0,99
5	0,92	0,94	1,00
6	0,10	0,87	1,03
7	0,03	0,69	1,01
8	0,01	0,01	0,98
9	0,01	0,01	0,99
10	0,01	0,01	0,99
11	0,00	0,01	0,86
Tras 2 horas a 5 °C	1,00 (a pH 4)	1,00 (a pH 4)	1,00 (a pH 9)

Tabla 10: perfil de temperatura actividad pH 4,0 o pH 6,5 como se determina utilizando el ensayo de punto final Suc-AAPF-pNA

5

Temp (°C)	Proteasa S53 1 de <i>Trametes cf versicolor</i> (del ejemplo 12, pH 4)	Proteasa S53 3 de <i>Meripilus giganteus</i> (del ejemplo 2, pH 4)	Protease 10R (pH 6,5)
15	0,16	0,07	0,01
25	0,36	0,23	0,02
37	1,00	0,58	0,06
50	0,79	1,00	0,13
60	0,16	0,44	0,35
70	0,08	0,08	0,96
80	-	-	1,00
90	-	-	0,18

Tabla 11: especificidad por P1 en 10 sustratos Suc-AAPX-pNA a pH 4,0 o pH 9,0 a 37°C como se determina utilizando el ensayo cinético Suc-AAPX-pNA

Suc-AAPX-pNA	Proteasa S53 1 de <i>Trametes cf versicolor</i> (del ejemplo 12, pH 4)	Proteasa S53 3 de <i>Meripilus giganteus</i> (del ejemplo 2, pH 4)	Proteasa 10R (pH 9)
Suc-AAPA-pNA	0,01	0,01	0,13
Suc-AAPR-pNA	0,00	0,00	0,09
Suc-AAPD-pNA	0,04	0,06	0,00
Suc-AAPI-pNA	0,00	0,00	0,00
Suc-AAPM-pNA	0,46	0,53	0,78
Suc-AAPV-pNA	0,00	0,00	0,01



Suc-AAPL-pNA	1,00	1,00	0,18
Suc-AAPE-pNA	0,03	0,05	0,00
Suc-AAPK-pNA	0,00	0,00	0,08
Suc-AAPF-pNA	0,81	0,99	1,00

[0395] La actividad en función del pH en el sustrato Suc-AAPF-pNA, el perfil de estabilidad en función del pH (actividad residual tras 2 horas a 37°C), el perfil de actividad en función de la temperatura en Suc-AAPF-pNA a pH 4,0 y la especificidad por P1 en 10 sustratos Suc-AAPF-pNA a pH 4,0 para la proteasa S53 1 de *Trametes cf versicolor* comparados con los datos para la proteasa S53 3 de *Meripilus giganteus* se muestran también en las figuras 1-4 siguientes.

#### Otras características para la proteasa S53 1 de *Trametes cf versicolor*

[0396] La determinación de la secuencia N-terminal fue: AIPASCASTI.

[0397] El peso molecular relativo como se determina por SDS-PAGE fue aprox. Mr = 42 kDa.

#### Confirmación de la secuencia madura para la proteasa S53 1 de *Trametes cf versicolor*

[0398] La muestra purificada se intercambió de tampón con 50 mM de tampón de acetato sódico a pH 5,5 utilizando una unidad de ultrafiltración Vivaspín equipada con un filtro de corte de 10 kDa. Después del intercambio de tampón, se añadió endoglicosidasa H y la muestra se incubó a 30°C durante 3 horas. Nota: para cada sitio N-enlazado deglicosilado un residuo de N-acetil hexosamina permanece en el esqueleto de proteína que aumenta el peso molecular con 203,19 Da por sitio. La muestra se analizó luego por espectrometría de masas.

[0399] El peso molecular determinado por análisis de peso molecular intacto del pico principal fue: 37467,6 Da, que se corresponde con 0,41 Da de la secuencia madura más una acetil hexosamina única y un residuo de cisteína no reticulada. La secuencia madura (a partir de datos de secuenciación de EDMAN N-terminal y datos de Intact MS):

AVPASCASITPAQLQALYGIPTTKATQSSNKLAVSGFIDQFANSADLKTFLGKFRTDISSSTTFTLQ  
 TLDGGSNSQSSSQAGVEANLDIQYTVGLASAVPTIFISVGDDFQDGDLEGFLDIINFLNESAPPQV  
 LTTSYGQNTISAKLANQLCNAYAQLGARGTSILFASGDGGVSGSQSSSCSKFVPTFSPGCPFM  
 TSVGATQGINPETAADFSSGGFSNVFARPSYQSTAVSSYLALGSTNSGKFNTSGRAFPDIATQGV  
 DFEIVVSGRTEGVDTSCASPTLAAIISLLNDRLIAAGKSPGLNPFLLYSAAGTAALTDITSGSNPG  
 CNTNGFPAKAGWDPVTGLGTPNFAKLLTAVGL (SEQ ID NO: 19).

El peso molecular calculado de esta secuencia madura es 37263,0 Da.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

[0400]

<110> Novozymes A/S

<120> USO DE POLIPÉPTIDOS CON ACTIVIDAD DE PROTEASA EN PIENSOS PARA ANIMALES

<130> 12355-WO-PCT

<150> EP 12183079.8

<151> 2012-09-05

<160> 25

# ES 2 694 765 T3

```

<170>  versión de PatentIn 3.5

<210>  1
<211>  1847
5  <212>  ADN
    <213>  Meripilus giganteus

<220>
10 <221>  CDS
    <222>  (11)..(1702)

<220>
15 <221>  sig_peptide
    <222>  (11)..(61)

<220>
20 <221>  mat_peptide
    <222>  (605)..(1702)

<400>  1

ctcgaacacg atg gtc gcc acc  agc ttg ctc gtt gcc  tcc cta ttc acg      49
      Met Val Ala Thr  Ser Leu Leu Val Ala  Ser Leu Phe Thr
25
      -195                                -190

ctc  gcc ctc ggc acg ccg  acg ggt cgc aac ctc  aag ctg cac gag      94
Leu  Ala Leu Gly Thr Pro  Thr Gly Arg Asn Leu  Lys Leu His Glu
-185                                -175
30

gcg  cgc gaa gac ctt cct  gcc ggt ttc tcg ctg  cgc ggc gcc gcc      139
Ala  Arg Glu Asp Leu Pro  Ala Gly Phe Ser Leu  Arg Gly Ala Ala
-170                                -160

35  tcg  ccc gac acg acg ctg  aag ctc cgc atc gcg  ctc gtg cag aac      184
Ser  Pro Asp Thr Thr Leu  Lys Leu Arg Ile Ala  Leu Val Gln Asn
-155                                -145

40  aac  ttc gcc gag ctc gaa  gac aag ctc tac gac  gtc agc aca ccg      229
Asn  Phe Ala Glu Leu Glu  Asp Lys Leu Tyr Asp  Val Ser Thr Pro
-140                                -130

      tcc  agc gcc aac tac ggc  aac cac ctc tcg aag  gaa gag gtt gag      274
Ser  Ser Ala Asn Tyr Gly  Asn His Leu Ser Lys  Glu Glu Val Glu
45  -125                                -115

      cag  tac att gct ccg gct  ccc gag agc gtg aaa  gcc gtg aat gcc      319
Gln  Tyr Ile Ala Pro Ala  Pro Glu Ser Val Lys  Ala Val Asn Ala
-110                                -100
50

tgg  ctc acc gag aac gga ctc  gac gcg cac acc att tcg ccc gcc ggc      367
Trp  Leu Thr Glu Asn Gly Leu  Asp Ala His Thr  Ile Ser Pro Ala Gly
-95                                -85

55  gac  tgg ctc gca ttc gag gtc  ccc gtc agc aag gcg aat gag ctc ttc      415
Asp  Trp Leu Ala Phe Glu Val  Pro Val Ser Lys Ala Asn Glu Leu Phe
      -75                                -65

      gac  gcc gac ttc tcc gtg ttt  acc cac gat gag tcc ggc ctc gag gct      463
Asp  Ala Asp Phe Ser Val Phe  Thr His Asp Glu Ser Gly Leu Glu Ala
60  -60                                -50

      atc  cgg acg ctg gcc tac tcc  atc cct gct gag ctt cag gga cac ctc      511
Ile  Arg Thr Leu Ala Tyr Ser  Ile Pro Ala Glu Leu Gln Gly His Leu
65  -45                                -35

      gac  ctt gtt cac ccc acc gtc  acg ttc ccg aac ccc aat gcg cac ctg      559
Asp  Leu Val His Pro Thr Val  Thr Phe Pro Asn Pro Asn Ala His Leu
      -30                                -20

```

# ES 2 694 765 T3

5	ccc gtc gtg cgc tcc acc cag ccc atc cgg aac ctg acc gga cgt gct Pro Val Val Arg Ser Thr Gln Pro Ile Arg Asn Leu Thr Gly Arg Ala -15 -10 -5 -1 1	607
10	ata ccg gcc tct tgc gcg agc acc atc acc cct gcg tgc ttg cag gcc Ile Pro Ala Ser Cys Ala Ser Thr Ile Thr Pro Ala Cys Leu Gln Ala 5 10 15	655
15	atc tac ggt atc ccc acc acc aag gct act cag tcc tcg aac aag ctc Ile Tyr Gly Ile Pro Thr Thr Lys Ala Thr Gln Ser Ser Asn Lys Leu 20 25 30	703
20	gct gtc agc ggc ttc atc gac cag ttt gcg aac aag gct gac ctg aag Ala Val Ser Gly Phe Ile Asp Gln Phe Ala Asn Lys Ala Asp Leu Lys 35 40 45	751
25	tca ttc ctg gcc cag ttc cgc aaa gac atc tca tcc tcc acg act ttc Ser Phe Leu Ala Gln Phe Arg Lys Asp Ile Ser Ser Ser Thr Thr Phe 50 55 60 65	799
30	tcg ctt cag act ctc gat ggt gga gag aac gac cag agc cct agc gag Ser Leu Gln Thr Leu Asp Gly Gly Glu Asn Asp Gln Ser Pro Ser Glu 70 75 80	847
35	gcg ggt atc gag gct aac ttg gat atc cag tac acc gtc ggc ctc gcc Ala Gly Ile Glu Ala Asn Leu Asp Ile Gln Tyr Thr Val Gly Leu Ala 85 90 95	895
40	acg ggc gtc cct acc acg ttc atc tcc gtc ggc gac gac ttc cag gat Thr Gly Val Pro Thr Thr Phe Ile Ser Val Gly Asp Asp Phe Gln Asp 100 105 110	943
45	ggc aac ttg gag ggc ttc ctg gac atc atc aac ttc ttg ctc ggc gag Gly Asn Leu Glu Gly Phe Leu Asp Ile Ile Asn Phe Leu Leu Gly Glu 115 120 125	991
50	agc aac ccg ccg cag gtc ctc acc acc agt tac ggc cag aac gag aac Ser Asn Pro Pro Gln Val Leu Thr Thr Ser Tyr Gly Gln Asn Glu Asn 130 135 140 145	1039
55	acg atc tcg gcc aag ctt gct aac caa ctt tgc aat gcg tac gct cag Thr Ile Ser Ala Lys Leu Ala Asn Gln Leu Cys Asn Ala Tyr Ala Gln 150 155 160	1087
60	ctc ggc gcg cgc ggc acc tct atc ctc ttc gcg tcg ggt gat ggc ggt Leu Gly Ala Arg Gly Thr Ser Ile Leu Phe Ala Ser Gly Asp Gly Gly 165 170 175	1135
65	gtg tcc ggc tcg cag tcc gcg cac tgc agc aat ttt gtc ccg aca ttc Val Ser Gly Ser Gln Ser Ala His Cys Ser Asn Phe Val Pro Thr Phe 180 185 190	1183
70	ccc tcc ggc tgc ccc ttc atg act tcc gtc ggc gcg acg cag ggc gtc Pro Ser Gly Cys Pro Phe Met Thr Ser Val Gly Ala Thr Gln Gly Val 195 200 205	1231
75	agc ccc gag act gcc gcc gcc ttc tca tcc ggc ggc ttc tcg aac gtg Ser Pro Glu Thr Ala Ala Ala Phe Ser Ser Gly Gly Phe Ser Asn Val 210 215 220 225	1279
80	ttc ggc atc ccg tcg tac cag gct tcc gcg gtc agc ggc tac ctg tcc Phe Gly Ile Pro Ser Tyr Gln Ala Ser Ala Val Ser Gly Tyr Leu Ser 230 235 240	1327
85	gcg ctc gga agc acg aac tcg ggc aag ttc aac cgc agc gga cgc gga Ala Leu Gly Ser Thr Asn Ser Gly Lys Phe Asn Arg Ser Gly Arg Gly 245 250 255	1375

# ES 2 694 765 T3

	ttc ccc gac gtc tcc acg caa ggc gtg gac ttc cag atc gtc agc ggc	1423
	Phe Pro Asp Val Ser Thr Gln Gly Val Asp Phe Gln Ile Val Ser Gly	
	260 265 270	
5	ggc cag acg atc ggc gtc gac ggc acg agc tgc gcc agc ccg acg ttc	1471
	Gly Gln Thr Ile Gly Val Asp Gly Thr Ser Cys Ala Ser Pro Thr Phe	
	275 280 285	
10	gcg agc gtc atc tcg ctg gta aac gac cgc ctc atc gcg gcc ggc aag	1519
	Ala Ser Val Ile Ser Leu Val Asn Asp Arg Leu Ile Ala Ala Gly Lys	
	290 295 300 305	
15	agc ccg ctc ggc ttc ctg aac ccc ttc ctg tac tcg tcg gcg ggc aag	1567
	Ser Pro Leu Gly Phe Leu Asn Pro Phe Leu Tyr Ser Ser Ala Gly Lys	
	310 315 320	
20	gcc gcg ctc aac gac gtc acg agt ggc tcg aac cct gcc tgc agc acg	1615
	Ala Ala Leu Asn Asp Val Thr Ser Gly Ser Asn Pro Gly Cys Ser Thr	
	325 330 335	
25	aac ggc ttc ccc gct aag gcc ggc tgg gac ccg gtc act ggt ctt ggc	1663
	Asn Gly Phe Pro Ala Lys Ala Gly Trp Asp Pro Val Thr Gly Leu Gly	
	340 345 350	
30	acg ccc aac ttt gcc aag ctc ctc acc gcg gtc ggc ctg tgaatgtgga	1712
	Thr Pro Asn Phe Ala Lys Leu Leu Thr Ala Val Gly Leu	
	355 360 365	
35	cgaaatacaa gaacgtggaa cgatgtgcac agtcagaagg aatgatcgcg cagtggcggt	1772
	gtactattgt agatgtacgg gcaaagatgt acaccttttt agcagtcaaa atgtaaacgt	1832
	gtttgcgtct ggctt	1847
40	<210> 2	
	<211> 564	
	<212> PRT	
	<213> Meripilus giganteus	
45	<400> 2	
	Met Val Ala Thr Ser Leu Leu Val Ala Ser Leu Phe Thr Leu Ala	
	-195 -190 -185	
50	Leu Gly Thr Pro Thr Gly Arg Asn Leu Lys Leu His Glu Ala Arg	
	-180 -175 -170	
55	Glu Asp Leu Pro Ala Gly Phe Ser Leu Arg Gly Ala Ala Ser Pro	
	-165 -160 -155	
60	Asp Thr Thr Leu Lys Leu Arg Ile Ala Leu Val Gln Asn Asn Phe	
	-150 -145 -140	
65	Ala Glu Leu Glu Asp Lys Leu Tyr Asp Val Ser Thr Pro Ser Ser	
	-135 -130 -125	
	Ala Asn Tyr Gly Asn His Leu Ser Lys Glu Glu Val Glu Gln Tyr	
	-120 -115 -110	
	Ile Ala Pro Ala Pro Glu Ser Val Lys Ala Val Asn Ala Trp Leu Thr	
	-105 -100 -95	

# ES 2 694 765 T3

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

# ES 2 694 765 T3

	Ser	Gln	Ser	Ala	His	Cys	Ser	Asn	Phe	Val	Pro	Thr	Phe	Pro	Ser	Gly	
					185					190					195		
5	Cys	Pro	Phe	Met	Thr	Ser	Val	Gly	Ala	Thr	Gln	Gly	Val	Ser	Pro	Glu	
				200					205					210			
10	Thr	Ala	Ala	Ala	Phe	Ser	Ser	Gly	Gly	Phe	Ser	Asn	Val	Phe	Gly	Ile	
				215				220					225				
15	Pro	Ser	Tyr	Gln	Ala	Ser	Ala	Val	Ser	Gly	Tyr	Leu	Ser	Ala	Leu	Gly	
		230					235					240					
20	Ser	Thr	Asn	Ser	Gly	Lys	Phe	Asn	Arg	Ser	Gly	Arg	Gly	Phe	Pro	Asp	
	245					250					255					260	
25	Val	Ser	Thr	Gln	Gly	Val	Asp	Phe	Gln	Ile	Val	Ser	Gly	Gly	Gln	Thr	
					265					270					275		
30	Ile	Gly	Val	Asp	Gly	Thr	Ser	Cys	Ala	Ser	Pro	Thr	Phe	Ala	Ser	Val	
				280					285					290			
35	Ile	Ser	Leu	Val	Asn	Asp	Arg	Leu	Ile	Ala	Ala	Gly	Lys	Ser	Pro	Leu	
			295					300					305				
40	Gly	Phe	Leu	Asn	Pro	Phe	Leu	Tyr	Ser	Ser	Ala	Gly	Lys	Ala	Ala	Leu	
		310					315					320					
45	Asn	Asp	Val	Thr	Ser	Gly	Ser	Asn	Pro	Gly	Cys	Ser	Thr	Asn	Gly	Phe	
	325					330					335					340	
50	Pro	Ala	Lys	Ala	Gly	Trp	Asp	Pro	Val	Thr	Gly	Leu	Gly	Thr	Pro	Asn	
					345					350					355		
55	Phe	Ala	Lys	Leu	Leu	Thr	Ala	Val	Gly	Leu							
				360					365								
60	<210>	3															
	<211>	1719															
	<212>	ADN															
	<213>	Secuencia artificial															
65	<220>																
	<223>	Constructo sintético															
	<220>																
	<221>	CDS															
	<222>	(1)..(1716)															
	<220>																
	<221>	mat_peptide															
	<222>	(595)..(1692)															
	<220>																
	<221>	misc_recomb															
	<222>	(1693)..(1716)															

# ES 2 694 765 T3

	<400> 3															
	atg	gtc	gcc	acc	agc	ttg	ctc	gtt	gcc	tcc	cta	ttc	acg	ctc	gcc	45
	Met	Val	Ala	Thr	Ser	Leu	Leu	Val	Ala	Ser	Leu	Phe	Thr	Leu	Ala	
				-195					-190					-185		
5																
	ctc	ggc	acg	ccg	acg	ggg	cgc	aac	ctc	aag	ctg	cac	gag	gcg	cgc	90
	Leu	Gly	Thr	Pro	Thr	Gly	Arg	Asn	Leu	Lys	Leu	His	Glu	Ala	Arg	
				-180					-175					-170		
10																
	gaa	gac	ctt	cct	gcc	ggg	ttc	tcg	ctg	cgc	ggc	gcc	gcc	tcg	ccc	135
	Glu	Asp	Leu	Pro	Ala	Gly	Phe	Ser	Leu	Arg	Gly	Ala	Ala	Ser	Pro	
				-165					-160					-155		
15																
	gac	acg	acg	ctg	aag	ctc	cgc	atc	gcg	ctc	gtg	cag	aac	aac	ttc	180
	Asp	Thr	Thr	Leu	Lys	Leu	Arg	Ile	Ala	Leu	Val	Gln	Asn	Asn	Phe	
				-150					-145					-140		
20																
	gcc	gag	ctc	gaa	gac	aag	ctc	tac	gac	gtc	agc	aca	ccg	tcc	agc	225
	Ala	Glu	Leu	Glu	Asp	Lys	Leu	Tyr	Asp	Val	Ser	Thr	Pro	Ser	Ser	
				-135					-130					-125		
25																
	gcc	aac	tac	ggc	aac	cac	ctc	tcg	aag	gaa	gag	gtt	gag	cag	tac	270
	Ala	Asn	Tyr	Gly	Asn	His	Leu	Ser	Lys	Glu	Glu	Val	Glu	Gln	Tyr	
				-120					-115					-110		
30																
	att	gct	ccg	gct	ccc	gag	agc	gtg	aaa	gcc	gtg	aat	gcc	tgg	ctc	318
	Ile	Ala	Pro	Ala	Pro	Glu	Ser	Val	Lys	Ala	Val	Asn	Ala	Trp	Leu	Thr
				-105					-100					-95		
35																
	gag	aac	gga	ctc	gac	gcg	cac	acc	att	tcg	ccc	gcc	ggc	gac	tgg	366
	Glu	Asn	Gly	Leu	Asp	Ala	His	Thr	Ile	Ser	Pro	Ala	Gly	Asp	Trp	Leu
				-90					-85					-80		
40																
	gca	ttc	gag	gtc	ccc	gtc	agc	aag	gcg	aat	gag	ctc	ttc	gac	gcc	414
	Ala	Phe	Glu	Val	Pro	Val	Ser	Lys	Ala	Asn	Glu	Leu	Phe	Asp	Ala	Asp
				-75					-70					-65		
45																
	ttc	tcc	gtg	ttt	acc	cac	gat	gag	tcc	ggc	ctc	gag	gct	atc	cgg	462
	Phe	Ser	Val	Phe	Thr	His	Asp	Glu	Ser	Gly	Leu	Glu	Ala	Ile	Arg	Thr
				-60					-55					-50		-45
50																
	ctg	gcc	tac	tcc	atc	cct	gct	gag	ctt	cag	gga	cac	ctc	gac	ctt	510
	Leu	Ala	Tyr	Ser	Ile	Pro	Ala	Glu	Leu	Gln	Gly	His	Leu	Asp	Leu	Val
					-40				-35					-30		
55																
	cac	ccc	acc	gtc	acg	ttc	ccg	aac	ccc	aat	gcg	cac	ctg	ccc	gtc	558
	His	Pro	Thr	Val	Thr	Phe	Pro	Asn	Pro	Asn	Ala	His	Leu	Pro	Val	Val
				-25					-20					-15		
60																
	cgc	tcc	acc	cag	ccc	atc	cgg	aac	ctg	acc	gga	cgt	gct	ata	ccg	606
	Arg	Ser	Thr	Gln	Pro	Ile	Arg	Asn	Leu	Thr	Gly	Arg	Ala	Ile	Pro	Ala
				-10					-5				-1	1		
65																
	tct	tgc	gcg	agc	acc	atc	acc	cct	gcg	tgc	ttg	cag	gcc	atc	tac	654
	Ser	Cys	Ala	Ser	Thr	Ile	Thr	Pro	Ala	Cys	Leu	Gln	Ala	Ile	Tyr	Gly
	5					10				15					20	
70																
	atc	ccc	acc	acc	aag	gct	act	cag	tcc	tcg	aac	aag	ctc	gct	gtc	702
	Ile	Pro	Thr	Thr	Lys	Ala	Thr	Gln	Ser	Ser	Asn	Lys	Leu	Ala	Val	Ser
					25				30					35		
75																
	ggc	ttc	atc	gac	cag	ttt	gcg	aac	aag	gct	gac	ctg	aag	tca	ttc	750
	Gly	Phe	Ile	Asp	Gln	Phe	Ala	Asn	Lys	Ala	Asp	Leu	Lys	Ser	Phe	Leu
				40					45					50		
80																
	gcc	cag	ttc	cgc	aaa	gac	atc	tca	tcc	tcc	acg	act	ttc	tcg	ctt	798
	Ala	Gln	Phe	Arg	Lys	Asp	Ile	Ser	Ser	Ser	Thr	Thr	Phe	Ser	Leu	Gln
				55				60					65			

# ES 2 694 765 T3

	act	ctc	gat	ggt	gga	gag	aac	gac	cag	agc	cct	agc	gag	gcg	ggt	atc	846
	Thr	Leu	Asp	Gly	Gly	Glu	Asn	Asp	Gln	Ser	Pro	Ser	Glu	Ala	Gly	Ile	
	70						75					80					
5	gag	gct	aac	ttg	gat	atc	cag	tac	acc	gtc	ggc	ctc	gcc	acg	ggc	gtc	894
	Glu	Ala	Asn	Leu	Asp	Ile	Gln	Tyr	Thr	Val	Gly	Leu	Ala	Thr	Gly	Val	
	85					90					95					100	
10	cct	acc	acg	ttc	atc	tcc	gtc	ggc	gac	gac	ttc	cag	gat	ggc	aac	ttg	942
	Pro	Thr	Thr	Phe	Ile	Ser	Val	Gly	Asp	Asp	Phe	Gln	Asp	Gly	Asn	Leu	
					105					110					115		
15	gag	ggc	ttc	ctg	gac	atc	atc	aac	ttc	ttg	ctc	ggc	gag	agc	aac	ccg	990
	Glu	Gly	Phe	Leu	Asp	Ile	Ile	Asn	Phe	Leu	Leu	Gly	Glu	Ser	Asn	Pro	
				120					125					130			
20	ccg	cag	gtc	ctc	acc	acc	agt	tac	ggc	cag	aac	gag	aac	acg	atc	tcg	1038
	Pro	Gln	Val	Leu	Thr	Thr	Ser	Tyr	Gly	Gln	Asn	Glu	Asn	Thr	Ile	Ser	
			135					140						145			
25	gcc	aag	ctt	gct	aac	caa	ctt	tgc	aat	gcg	tac	gct	cag	ctc	ggc	gcg	1086
	Ala	Lys	Leu	Ala	Asn	Gln	Leu	Cys	Asn	Ala	Tyr	Ala	Gln	Leu	Gly	Ala	
	150						155					160					
30	cgc	ggc	acc	tct	atc	ctc	ttc	gcg	tcg	ggt	gat	ggc	ggt	gtg	tcc	ggc	1134
	Arg	Gly	Thr	Ser	Ile	Leu	Phe	Ala	Ser	Gly	Asp	Gly	Gly	Val	Ser	Gly	
	165					170					175					180	
35	tcg	cag	tcc	gcg	cac	tgc	agc	aat	ttt	gtc	ccg	aca	ttc	ccc	tcc	ggc	1182
	Ser	Gln	Ser	Ala	His	Cys	Ser	Asn	Phe	Val	Pro	Thr	Phe	Pro	Ser	Gly	
					185					190					195		
40	tgc	ccc	ttc	atg	act	tcc	gtc	ggc	gcg	acg	cag	ggc	gtc	agc	ccc	gag	1230
	Cys	Pro	Phe	Met	Thr	Ser	Val	Gly	Ala	Thr	Gln	Gly	Val	Ser	Pro	Glu	
				200					205					210			
45	act	gcc	gcc	gcc	ttc	tca	tcc	ggc	ggc	ttc	tcg	aac	gtg	ttc	ggc	atc	1278
	Thr	Ala	Ala	Ala	Phe	Ser	Ser	Gly	Gly	Phe	Ser	Asn	Val	Phe	Gly	Ile	
				215					220					225			
50	ccg	tcg	tac	cag	gct	tcc	gcg	gtc	agc	ggc	tac	ctg	tcc	gcg	ctc	gga	1326
	Pro	Ser	Tyr	Gln	Ala	Ser	Ala	Val	Ser	Gly	Tyr	Leu	Ser	Ala	Leu	Gly	
		230					235					240					
55	agc	acg	aac	tcg	ggc	aag	ttc	aac	cgc	agc	gga	cgc	gga	ttc	ccc	gac	1374
	Ser	Thr	Asn	Ser	Gly	Lys	Phe	Asn	Arg	Ser	Gly	Arg	Gly	Phe	Pro	Asp	
	245					250					255					260	
60	gtc	tcc	acg	caa	ggc	gtg	gac	ttc	cag	atc	gtc	agc	ggc	ggc	cag	acg	1422
	Val	Ser	Thr	Gln	Gly	Val	Asp	Phe	Gln	Ile	Val	Ser	Gly	Gly	Gln	Thr	
					265					270					275		
65	atc	ggc	gtc	gac	ggc	acg	agc	tgc	gcc	agc	ccg	acg	ttc	gcg	agc	gtc	1470
	Ile	Gly	Val	Asp	Gly	Thr	Ser	Cys	Ala	Ser	Pro	Thr	Phe	Ala	Ser	Val	
				280					285					290			
70	atc	tcg	ctg	gta	aac	gac	cgc	ctc	atc	gcg	gcc	ggc	aag	agc	ccg	ctc	1518
	Ile	Ser	Leu	Val	Asn	Asp	Arg	Leu	Ile	Ala	Ala	Gly	Lys	Ser	Pro	Leu	
			295					300					305				
75	ggc	ttc	ctg	aac	ccc	ttc	ctg	tac	tcg	tcg	gcg	ggc	aag	gcc	gcg	ctc	1566
	Gly	Phe	Leu	Asn	Pro	Phe	Leu	Tyr	Ser	Ser	Ala	Gly	Lys	Ala	Ala	Leu	
		310					315					320					
80	aac	gac	gtc	acg	agt	ggc	tcg	aac	cct	ggc	tgc	agc	acg	aac	ggc	ttc	1614
	Asn	Asp	Val	Thr	Ser	Gly	Ser	Asn	Pro	Gly	Cys	Ser	Thr	Asn	Gly	Phe	
	325					330					335					340	
85	ccc	gct	aag	gcc	ggc	tgg	gac	ccg	gtc	act	ggt	ctt	ggc	acg	ccc	aac	1662



# ES 2 694 765 T3

	Pro	Ala	Lys	Ala	Gly	Trp	Asp	Pro	Val	Thr	Gly	Leu	Gly	Thr	Pro	Asn	
					345					350					355		
5	ttt	gcc	aag	ctc	ctc	acc	gcg	gtc	ggc	ctg	cga	cat	cag	cac	cag	cat	1710
	Phe	Ala	Lys	Leu	Leu	Thr	Ala	Val	Gly	Leu	Arg	His	Gln	His	Gln	His	
				360					365				370				
10	cag	cac	tga														1719
	Gln	His															
15	<210>	4															
	<211>	572															
	<212>	PRT															
	<213>	Secuencia artificial															
20	<220>																
	<223>	Constructo sintético															
	<400>	4															
25	Met	Val	Ala	Thr	Ser	Leu	Leu	Val	Ala	Ser	Leu	Phe	Thr	Leu	Ala		
				-195					-190						-185		
30	Leu	Gly	Thr	Pro	Thr	Gly	Arg	Asn	Leu	Lys	Leu	His	Glu	Ala	Arg		
				-180					-175						-170		
35	Glu	Asp	Leu	Pro	Ala	Gly	Phe	Ser	Leu	Arg	Gly	Ala	Ala	Ser	Pro		
				-165					-160						-155		
40	Ala	Glu	Leu	Glu	Asp	Lys	Leu	Tyr	Asp	Val	Ser	Thr	Pro	Ser	Ser		
				-135					-130						-125		
45	Ala	Asn	Tyr	Gly	Asn	His	Leu	Ser	Lys	Glu	Glu	Val	Glu	Gln	Tyr		
				-120					-115						-110		
50	Ile	Ala	Pro	Ala	Pro	Glu	Ser	Val	Lys	Ala	Val	Asn	Ala	Trp	Leu	Thr	
				-105					-100						-95		
55	Glu	Asn	Gly	Leu	Asp	Ala	His	Thr	Ile	Ser	Pro	Ala	Gly	Asp	Trp	Leu	
				-90				-85					-80				
60	Ala	Phe	Glu	Val	Pro	Val	Ser	Lys	Ala	Asn	Glu	Leu	Phe	Asp	Ala	Asp	
		-75					-70					-65					
65	Phe	Ser	Val	Phe	Thr	His	Asp	Glu	Ser	Gly	Leu	Glu	Ala	Ile	Arg	Thr	
	-60					-55					-50					-45	
	Leu	Ala	Tyr	Ser	Ile	Pro	Ala	Glu	Leu	Gln	Gly	His	Leu	Asp	Leu	Val	
				-40						-35					-30		
	His	Pro	Thr	Val	Thr	Phe	Pro	Asn	Pro	Asn	Ala	His	Leu	Pro	Val	Val	
				-25				-20						-15			

# ES 2 694 765 T3

	Arg	Ser	Thr	Gln	Pro	Ile	Arg	Asn	Leu	Thr	Gly	Arg	Ala	Ile	Pro	Ala	
			-10					-5				-1	1				
5	Ser	Cys	Ala	Ser	Thr	Ile	Thr	Pro	Ala	Cys	Leu	Gln	Ala	Ile	Tyr	Gly	
	5					10					15					20	
10	Ile	Pro	Thr	Thr	Lys	Ala	Thr	Gln	Ser	Ser	Asn	Lys	Leu	Ala	Val	Ser	
					25					30					35		
15	Gly	Phe	Ile	Asp	Gln	Phe	Ala	Asn	Lys	Ala	Asp	Leu	Lys	Ser	Phe	Leu	
				40					45					50			
20	Ala	Gln	Phe	Arg	Lys	Asp	Ile	Ser	Ser	Ser	Thr	Thr	Phe	Ser	Leu	Gln	
			55					60					65				
25	Thr	Leu	Asp	Gly	Gly	Glu	Asn	Asp	Gln	Ser	Pro	Ser	Glu	Ala	Gly	Ile	
		70					75					80					
30	Glu	Ala	Asn	Leu	Asp	Ile	Gln	Tyr	Thr	Val	Gly	Leu	Ala	Thr	Gly	Val	
	85					90					95					100	
35	Pro	Thr	Thr	Phe	Ile	Ser	Val	Gly	Asp	Asp	Phe	Gln	Asp	Gly	Asn	Leu	
					105					110					115		
40	Glu	Gly	Phe	Leu	Asp	Ile	Ile	Asn	Phe	Leu	Leu	Gly	Glu	Ser	Asn	Pro	
				120					125					130			
45	Pro	Gln	Val	Leu	Thr	Thr	Ser	Tyr	Gly	Gln	Asn	Glu	Asn	Thr	Ile	Ser	
			135					140					145				
50	Ala	Lys	Leu	Ala	Asn	Gln	Leu	Cys	Asn	Ala	Tyr	Ala	Gln	Leu	Gly	Ala	
		150					155					160					
55	Arg	Gly	Thr	Ser	Ile	Leu	Phe	Ala	Ser	Gly	Asp	Gly	Gly	Val	Ser	Gly	
	165					170					175					180	
60	Ser	Gln	Ser	Ala	His	Cys	Ser	Asn	Phe	Val	Pro	Thr	Phe	Pro	Ser	Gly	
					185					190					195		
65	Cys	Pro	Phe	Met	Thr	Ser	Val	Gly	Ala	Thr	Gln	Gly	Val	Ser	Pro	Glu	
				200					205					210			
70	Thr	Ala	Ala	Ala	Phe	Ser	Ser	Gly	Gly	Phe	Ser	Asn	Val	Phe	Gly	Ile	
			215					220					225				
75	Pro	Ser	Tyr	Gln	Ala	Ser	Ala	Val	Ser	Gly	Tyr	Leu	Ser	Ala	Leu	Gly	
		230					235					240					
80	Ser	Thr	Asn	Ser	Gly	Lys	Phe	Asn	Arg	Ser	Gly	Arg	Gly	Phe	Pro	Asp	
	245					250					255					260	

# ES 2 694 765 T3

Val Ser Thr Gln Gly Val Asp Phe Gln Ile Val Ser Gly Gly Gln Thr  
265 270 275

5 Ile Gly Val Asp Gly Thr Ser Cys Ala Ser Pro Thr Phe Ala Ser Val  
280 285 290

10 Ile Ser Leu Val Asn Asp Arg Leu Ile Ala Ala Gly Lys Ser Pro Leu  
295 300 305

15 Gly Phe Leu Asn Pro Phe Leu Tyr Ser Ser Ala Gly Lys Ala Ala Leu  
310 315 320

20 Asn Asp Val Thr Ser Gly Ser Asn Pro Gly Cys Ser Thr Asn Gly Phe  
325 330 335 340

25 Pro Ala Lys Ala Gly Trp Asp Pro Val Thr Gly Leu Gly Thr Pro Asn  
345 350 355

30 Phe Ala Lys Leu Leu Thr Ala Val Gly Leu Arg His Gln His Gln His  
360 365 370

Gln His

35 <210> 5  
<211> 366  
<212> PRT  
<213> Meripilus giganteus  
<400> 5

40 Ala Ile Pro Ala Ser Cys Ala Ser Thr Ile Thr Pro Ala Cys Leu Gln  
1 5 10 15

45 Ala Ile Tyr Gly Ile Pro Thr Thr Lys Ala Thr Gln Ser Ser Asn Lys  
20 25 30

50 Leu Ala Val Ser Gly Phe Ile Asp Gln Phe Ala Asn Lys Ala Asp Leu  
35 40 45

55 Lys Ser Phe Leu Ala Gln Phe Arg Lys Asp Ile Ser Ser Ser Thr Thr  
50 55 60

60 Phe Ser Leu Gln Thr Leu Asp Gly Gly Glu Asn Asp Gln Ser Pro Ser  
65 70 75 80

65 Glu Ala Gly Ile Glu Ala Asn Leu Asp Ile Gln Tyr Thr Val Gly Leu  
85 90 95

Ala Thr Gly Val Pro Thr Thr Phe Ile Ser Val Gly Asp Asp Phe Gln  
100 105 110

Asp Gly Asn Leu Glu Gly Phe Leu Asp Ile Ile Asn Phe Leu Leu Gly  
115 120 125

## ES 2 694 765 T3

[illegible]

# ES 2 694 765 T3

<400> 6

5	Ala	Ile	Pro	Ala	Ser	Cys	Ala	Ser	Thr	Ile	Thr	Pro	Ala	Cys	Leu	Gln	1	5	10	15
10	Ala	Ile	Tyr	Gly	Ile	Pro	Thr	Thr	Lys	Ala	Thr	Gln	Ser	Ser	Asn	Lys	20	25	30	
15	Leu	Ala	Val	Ser	Gly	Phe	Ile	Asp	Gln	Phe	Ala	Asn	Lys	Ala	Asp	Leu	35	40	45	
20	Lys	Ser	Phe	Leu	Ala	Gln	Phe	Arg	Lys	Asp	Ile	Ser	Ser	Ser	Thr	Thr	50	55	60	
25	Phe	Ser	Leu	Gln	Thr	Leu	Asp	Gly	Gly	Glu	Asn	Asp	Gln	Ser	Pro	Ser	65	70	75	
30	Glu	Ala	Gly	Ile	Glu	Ala	Asn	Leu	Asp	Ile	Gln	Tyr	Thr	Val	Gly	Leu	85	90	95	
35	Ala	Thr	Gly	Val	Pro	Thr	Thr	Phe	Ile	Ser	Val	Gly	Asp	Asp	Phe	Gln	100	105	110	
40	Asp	Gly	Asn	Leu	Glu	Gly	Phe	Leu	Asp	Ile	Ile	Asn	Phe	Leu	Leu	Gly	115	120	125	
45	Glu	Ser	Asn	Pro	Pro	Gln	Val	Leu	Thr	Thr	Ser	Tyr	Gly	Gln	Asn	Glu	130	135	140	
50	Asn	Thr	Ile	Ser	Ala	Lys	Leu	Ala	Asn	Gln	Leu	Cys	Asn	Ala	Tyr	Ala	145	150	155	
55	Gln	Leu	Gly	Ala	Arg	Gly	Thr	Ser	Ile	Leu	Phe	Ala	Ser	Gly	Asp	Gly	165	170	175	
60	Gly	Val	Ser	Gly	Ser	Gln	Ser	Ala	His	Cys	Ser	Asn	Phe	Val	Pro	Thr	180	185	190	
65	Phe	Pro	Ser	Gly	Cys	Pro	Phe	Met	Thr	Ser	Val	Gly	Ala	Thr	Gln	Gly	195	200	205	
70	Val	Ser	Pro	Glu	Thr	Ala	Ala	Ala	Phe	Ser	Ser	Gly	Gly	Phe	Ser	Asn	210	215	220	
75	Val	Phe	Gly	Ile	Pro	Ser	Tyr	Gln	Ala	Ser	Ala	Val	Ser	Gly	Tyr	Leu	225	230	235	
80	Ser	Ala	Leu	Gly	Ser	Thr	Asn	Ser	Gly	Lys	Phe	Asn	Arg	Ser	Gly	Arg	245	250	255	
85	Gly	Phe	Pro	Asp	Val	Ser	Thr	Gln	Gly	Val	Asp	Phe	Gln	Ile	Val	Ser	260	265	270	

# ES 2 694 765 T3

Gly Gly Gln Thr Ile Gly Val Asp Gly Thr Ser Cys Ala Ser Pro Thr  
 275 280 285  
 5  
 Phe Ala Ser Val Ile Ser Leu Val Asn Asp Arg Leu Ile Ala Ala Gly  
 290 295 300  
 10  
 Lys Ser Pro Leu Gly Phe Leu Asn Pro Phe Leu Tyr Ser Ser Ala Gly  
 305 310 315 320  
 15  
 Lys Ala Ala Leu Asn Asp Val Thr Ser Gly Ser Asn Pro Gly Cys Ser  
 325 330 335  
 20  
 Thr Asn Gly Phe Pro Ala Lys Ala Gly Trp Asp Pro Val Thr Gly Leu  
 340 345 350  
 25  
 Gly Thr Pro Asn Phe Ala Lys Leu Leu Thr Ala Val Gly Leu Arg His  
 355 360 365  
 30  
 Gln His Gln  
 370  
 35  
 <210> 7  
 <211> 1596  
 <212> ADN  
 <213> Nocardiosis sp.  
 40  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (318)..(1463)  
 45  
 <220>  
 <221> sig\_peptide  
 <222> (318)..(404)  
 50  
 <220>  
 <221> mat\_peptide  
 <222> (900)..(1463)  
 55  
 <400> 7  
 acgtttggtta cgggtaccgg tgtccgcatg tggccagaat gcccccttgc gacagggaac 60  
 ggattcggtc ggtagcgcac cgactccgac aaccgcgagg tggccgttcg cgtcgccacg 120  
 ttctgcgacc gtcacgcgac ccacatcatcgt gtgacccac cgagctctga atggtccacc 180  
 60  
 gttctgacgg tctttccctc accaaaacgt gcacctatgg ttaggacggt gtttaccgaa 240  
 tgtctcgggtg aacgacaggg gccggacggt attcggcccc gatcccccggt tgatcccccc 300  
 65  
 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  
 70  
 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  
 75  
 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

# ES 2 694 765 T3

				-165				-160					-155				
	gcc	gac	gcg	gtc	tcc	atg	cag	gag	gcg	ctc	cag	cgc	gac	ctc	gac		485
5	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
10	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			
15	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			
20	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
25	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
30	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			
35	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
40	Val	Glu	Val	Thr	Ser	Asp	Gln	Pro	Glu	Leu	Tyr	Ala	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
45	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
50	Ala	Thr	Asn	Ala	Ala	Gly	Gln	Pro	Gly	Phe	Val	Thr	Ala	Gly	His	Cys	
				25					30						35		
	ggc	cgc	gtg	ggc	acc	cag	gtg	acc	atc	ggc	aac	ggc	agg	ggc	gtc	ttc	1055
	Gly	Arg	Val	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Ile	Gly	Asn	Gly	Arg	Gly	Val	Phe	
				40					45				50				
55	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
60	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
65	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		

# ES 2 694 765 T3

cgc ggc cag tcg gtg agc tac ccc gag ggc acc gtc acc aac atg acc 1295  
 Arg Gly Gln Ser Val Ser Tyr Pro Glu Gly Thr Val Thr Asn Met Thr  
 120 125 130  
 5 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  
 10 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  
 15 cgc acc ggc ggc 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  
 20 tcc tgg ggc gtc cgt ctc cgg acc tgatccccgc ggttcaggc ggaccgacgg 1493  
 Ser Trp Gly Val Arg Leu Arg Thr  
 185  
 tcgtgacctg agtaccaggc gtccccgccg cttccagcgg cgtccgcacc ggggtgggac 1553  
 25 cgggctgtggc cacggcccca cccgtgaccg gaccgcccgg cta 1596  
 <210> 8  
 <211> 382  
 <212> PRT  
 30 <213> Nocardiopsis sp.  
 <400> 8  
 35 Met Arg Pro Ser Pro Val Val Ser Ala Ile Gly Thr Gly Ala Leu  
 -190 -185 -180  
 40 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  
 45 Ser Met Gln Glu Ala Leu Gln Arg Asp Leu Asp Leu Thr Ser Ala  
 -145 -140 -135  
 50 Glu Ala Glu Glu Leu Leu Ala Ala Gln Asp Thr Ala Phe Glu Val  
 -130 -125 -120  
 55 Asp Glu Ala Ala Ala Glu Ala Ala Gly Asp Ala Tyr Gly Gly Ser  
 -115 -110 -105  
 60 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  
 65 Ser Tyr Gly Ile Asp Gly Leu Asp Glu Ile Val Gln Glu Leu Asn Ala  
 -70 -65 -60



# ES 2 694 765 T3

	Ala	Asp	Ala	Val	Pro	Gly	Val	Val	Gly	Trp	Tyr	Pro	Asp	Val	Ala	Gly	
	-55					-50						-45					
5	Asp	Thr	Val	Val	Leu	Glu	Val	Leu	Glu	Gly	Ser	Gly	Ala	Asp	Val	Ser	
	-40					-35					-30					-25	
10	Gly	Leu	Leu	Ala	Asp	Ala	Gly	Val	Asp	Ala	Ser	Ala	Val	Glu	Val	Thr	
					-20					-15					-10		
15	Thr	Ser	Asp	Gln	Pro	Glu	Leu	Tyr	Ala	Asp	Ile	Ile	Gly	Gly	Leu	Ala	
				-5				-1	1				5				
20	Tyr	Thr	Met	Gly	Gly	Arg	Cys	Ser	Val	Gly	Phe	Ala	Ala	Thr	Asn	Ala	
	10						15					20					
25	Ala	Gly	Gln	Pro	Gly	Phe	Val	Thr	Ala	Gly	His	Cys	Gly	Arg	Val	Gly	
	25					30					35					40	
30	Thr	Gln	Val	Thr	Ile	Gly	Asn	Gly	Arg	Gly	Val	Phe	Glu	Gln	Ser	Val	
					45					50					55		
35	Phe	Pro	Gly	Asn	Asp	Ala	Ala	Phe	Val	Arg	Gly	Thr	Ser	Asn	Phe	Thr	
				60					65					70			
40	Leu	Thr	Asn	Leu	Val	Ser	Arg	Tyr	Asn	Thr	Gly	Gly	Tyr	Ala	Thr	Val	
			75					80					85				
45	Ala	Gly	His	Asn	Gln	Ala	Pro	Ile	Gly	Ser	Ser	Val	Cys	Arg	Ser	Gly	
	90						95					100					
50	Ser	Thr	Thr	Gly	Trp	His	Cys	Gly	Thr	Ile	Gln	Ala	Arg	Gly	Gln	Ser	
	105					110					115					120	
55	Val	Ser	Tyr	Pro	Glu	Gly	Thr	Val	Thr	Asn	Met	Thr	Arg	Thr	Thr	Val	
					125					130					135		
60	Cys	Ala	Glu	Pro	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Ser	Tyr	Ile	Ser	Gly	Thr	Gln	
				140					145					150			
65	Ala	Gln	Gly	Val	Thr	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Asn	Cys	Arg	Thr	Gly	Gly	
			155					160					165				
70	Thr	Thr	Phe	Tyr	Gln	Glu	Val	Thr	Pro	Met	Val	Asn	Ser	Trp	Gly	Val	
	170						175					180					
75	Arg	Leu	Arg	Thr													
	185																
80	<210>	9															
	<211>	600															
	<212>	PRT															
	<213>	Grifola frondosa															

# ES 2 694 765 T3

<400> 9

5	Met	Ser	Leu	Gly	Arg	Arg	Ala	Ser	Ile	Lys	Gly	Leu	Leu	Ser	Ser	Ala	1	5	10	15
10	Leu	Ile	Thr	Pro	Arg	Val	Pro	Leu	Ser	Glu	Gln	Ser	His	Pro	Ser	Asn	20	25	30	
15	Met	Ile	Thr	Ser	Ser	Phe	Leu	Val	Val	Ser	Leu	Phe	Thr	Leu	Ala	Leu	35	40	45	
20	Ser	Lys	Pro	Met	Ser	Arg	Ser	Met	Lys	Val	His	Glu	Thr	Arg	Glu	Gly	50	55	60	
25	Ile	Pro	Asp	Gly	Phe	Ala	Leu	Ala	Gly	Ser	Pro	Ser	Ser	Asp	Thr	Ser	65	70	75	80
30	Leu	Asn	Leu	Arg	Ile	Ala	Leu	Val	Gln	Asn	Asp	Pro	Ala	Gly	Leu	Glu	85	90	95	
35	Thr	Ala	Leu	Tyr	Asp	Val	Asn	Thr	Pro	Ser	Ser	Ala	Asn	Tyr	Gly	Asn	100	105	110	
40	His	Leu	Ser	Lys	Ala	Glu	Val	Glu	Lys	Phe	Val	Ala	Pro	Glu	Pro	Glu	115	120	125	
45	Ser	Val	Asp	Ala	Val	Asn	Ala	Trp	Leu	Glu	Glu	Asn	Gly	Leu	Thr	Ala	130	135	140	
50	Thr	Thr	Ile	Ser	Pro	Ala	Gly	Asp	Trp	Leu	Ala	Phe	Glu	Val	Pro	Val	145	150	155	160
55	Ser	Lys	Ala	Asn	Glu	Leu	Phe	Asp	Ala	Asp	Phe	Ser	Val	Tyr	Thr	His	165	170	175	
60	Thr	Asp	Thr	Gly	Leu	Glu	Ala	Ile	Arg	Thr	Leu	Ser	Tyr	Ser	Ile	Pro	180	185	190	
65	Ala	Glu	Leu	Gln	Gly	His	Leu	Asp	Leu	Val	His	Pro	Thr	Ile	Thr	Phe	195	200	205	
	Pro	Asn	Pro	Tyr	Ser	Arg	Leu	Pro	Val	Val	Ala	Ser	Ser	Ile	Lys	Thr	210	215	220	
	Ala	Ala	Pro	Thr	Ser	Asp	Asn	Leu	Thr	Ser	Leu	Ala	Val	Pro	Ser	Ser	225	230	235	240
	Cys	Ala	Ser	Thr	Ile	Thr	Pro	Ala	Cys	Leu	Gln	Ala	Leu	Tyr	Gly	Ile	245	250	255	
	Pro	Thr	Thr	Pro	Ala	Thr	Gln	Ser	Ser	Asn	Lys	Leu	Ala	Val	Ser	Gly	260	265	270	

# ES 2 694 765 T3

	Tyr	Ile	Glu	Gln	Phe	Ala	Asn	Gln	Ala	Asp	Leu	Lys	Thr	Phe	Leu	Thr	
			275					280					285				
5	Lys	Phe	Arg	Thr	Asp	Ile	Ser	Ser	Ser	Thr	Thr	Phe	Thr	Thr	Gln	Thr	
		290					295					300					
10	Leu	Asp	Gly	Gly	Glu	Asn	Pro	Gln	Asn	Gly	Asn	Glu	Ala	Gly	Val	Glu	
	305					310					315					320	
15	Ala	Asp	Leu	Asp	Val	Gln	Tyr	Thr	Val	Gly	Leu	Ala	Thr	Asp	Val	Pro	
					325					330					335		
20	Thr	Val	Phe	Ile	Ser	Val	Gly	Asp	Asn	Phe	Gln	Asp	Gly	Ala	Leu	Glu	
				340					345					350			
25	Gly	Phe	Leu	Asp	Ile	Ile	Asn	Phe	Leu	Leu	Asp	Glu	Ser	Thr	Pro	Pro	
			355					360					365				
30	Gln	Val	Leu	Thr	Thr	Ser	Tyr	Gly	Gln	Asn	Glu	Asn	Thr	Ile	Ser	Arg	
		370					375					380					
35	Asn	Leu	Ala	Asn	Asn	Leu	Cys	Asn	Ala	Tyr	Ala	Gln	Leu	Gly	Ala	Arg	
	385					390					395					400	
40	Gly	Thr	Ser	Ile	Leu	Phe	Ala	Ser	Gly	Asp	Gly	Gly	Val	Ser	Gly	Ser	
					405					410					415		
45	Gln	Ser	Asp	Ser	Cys	Ser	Lys	Phe	Val	Pro	Thr	Phe	Pro	Ser	Gly	Cys	
				420					425					430			
50	Pro	Phe	Met	Thr	Ser	Val	Gly	Ala	Thr	Thr	Gly	Ile	Asn	Pro	Glu	Thr	
			435					440					445				
55	Ala	Ala	Asp	Phe	Ser	Ser	Gly	Gly	Phe	Ser	Asn	Tyr	Phe	Gly	Thr	Pro	
	450						455					460					
60	Ser	Tyr	Gln	Ala	Ser	Ala	His	Ser	Ala	Tyr	Leu	Gln	Ala	Leu	Gly	Ser	
	465					470					475					480	
65	Thr	Asn	Ala	Gly	Lys	Phe	Asn	Thr	Ser	Gly	Arg	Gly	Phe	Pro	Asp	Val	
					485					490					495		
70	Ser	Thr	Gln	Gly	Glu	Asn	Phe	Gln	Ile	Val	Val	Asp	Gly	Gln	Thr	Gly	
				500					505					510			
75	Thr	Val	Asp	Gly	Thr	Ser	Cys	Ala	Ser	Pro	Thr	Phe	Ala	Ser	Val	Val	
			515					520					525				
80	Ser	Leu	Leu	Asn	Asp	Arg	Leu	Ile	Ala	Ala	Gly	Lys	Ser	Pro	Leu	Gly	
	530						535					540					

# ES 2 694 765 T3

Phe Leu Asn Pro Phe Leu Tyr Ser Thr Gly Ala Ser Ala Phe Asn Ser  
 545 550 555 560

5 Ile Thr Ser Gly Ser Asn Pro Gly Cys Asn Thr Asn Gly Phe Pro Ala  
 565 570 575

10 Lys Thr Gly Trp Ser Pro Val Thr Gly Leu Gly Thr Pro Asn Phe Ala  
 580 585 590

15 Lys Leu Leu Thr Ala Val Gly Leu  
 595 600

20 <210> 10  
 <211> 560  
 <212> PRT  
 <213> Postia placenta  
 <400> 10

25 Met Phe Ala His Ala Val Leu Val Ala Ala Leu Leu Pro Leu Thr Leu  
 1 5 10 15

30 Ala Ser Pro Leu Ala Thr Arg Asn Met His Val Leu Ala Arg Arg Ser  
 20 25 30

35 Gly Pro Pro Ala Arg Phe Ser Met Ala Gly Ala Ala Ser Pro Asp Ala  
 35 40 45

40 Thr Leu Asn Leu Arg Val Ala Leu Thr Gln Ser Asn Pro Ala Gly Leu  
 50 55 60

45 Glu Asp Ala Leu Tyr Asp Val Ser Thr Pro Ser Ser Ala Asn Tyr Gly  
 65 70 75 80

50 Asn His Leu Thr Lys Glu Glu Ala Ala Ala Phe Val Ala Pro Thr Lys  
 85 90 95

55 Glu Ala Thr Ala Ala Val Thr Ser Trp Leu Asn Asn Asn Gly Val Asn  
 100 105 110

60 Tyr Thr Thr Leu Thr Pro Ala Gly Asp Trp Leu Ser Leu Thr Val Pro  
 115 120 125

65 Val Ser Gln Ala Asn Glu Leu Phe Gly Ala Gln Phe Asn Val Tyr Thr  
 130 135 140

70 Asp Glu Thr Thr Gly Gln Gln Thr Val Arg Thr Met Ser Tyr Ala Val  
 145 150 155 160

75 Pro Gln Thr Leu Ala Ala His Leu Thr Val Val Tyr Pro Thr Thr Thr  
 165 170 175

80 Lys Gly Lys Thr Gly Gly Lys Ala Gly Gly Lys Ala Asn Ser Thr Ala  
 180 185 190

# ES 2 694 765 T3

Ser Ala Ser Gly Val Ala Ala Ser Cys Ala Asn Thr Ile Thr Pro Ala  
 195 200 205  
 5  
 Cys Leu Gln Ser Leu Tyr Gly Ile Pro Thr Thr Pro Ala Thr Gln Ser  
 210 215 220  
 10  
 Ser Asn Gln Leu Gly Val Ser Gly Phe Ile Asp Gln Phe Ala Asn Gln  
 225 230 235 240  
 15  
 Ala Asp Leu Lys Thr Phe Leu Thr Thr Leu Arg Pro Asp Leu Ser Ser  
 245 250 255  
 20  
 Ser Thr Thr Phe Ser Leu Gln Thr Leu Asp Gly Gly Glu Asn Ser Gln  
 260 265 270  
 25  
 Thr Ala Gln Asp Ala Gly Thr Glu Ala Asn Leu Asp Thr Gln Tyr Thr  
 275 280 285  
 Val Gly Leu Ala Thr Gly Val Pro Thr Thr Phe Ile Ser Val Gly Glu  
 290 295 300  
 30  
 Lys Asn Gln Asp Gly Asp Leu Gly Gly Phe Leu Asp Ile Met Asn Phe  
 305 310 315 320  
 35  
 Leu Leu Asn Glu Asn Asp Pro Pro Ala Val Leu Thr Thr Ser Tyr Gly  
 325 330 335  
 40  
 Asp Asn Glu Asp Ala Ile Pro Val Gly Met Ala Asp Asn Leu Cys Asn  
 340 345 350  
 45  
 Ala Val Ala Gln Leu Gly Ala Arg Gly Val Ser Val Leu Phe Ala Ser  
 355 360 365  
 Gly Asp Gly Gly Val Ser Gly Ser Gln Ala Ala Gln Cys Thr Asp Phe  
 370 375 380  
 50  
 Val Pro Thr Phe Pro Ser Gly Cys Pro Tyr Leu Thr Ser Val Gly Ala  
 385 390 395 400  
 55  
 Thr Thr Gly Asn Ser Pro Glu Thr Ala Ala Ser Phe Ser Ala Gly Gly  
 405 410 415  
 60  
 Phe Ser Asn Tyr Phe Gly Thr Pro Ser Tyr Gln Ala Thr Ala Val Ser  
 420 425 430  
 65  
 Thr Tyr Leu Asn Thr Leu Gly Thr Thr Asn Lys Gly Leu Phe Asn Ala  
 435 440 445  
 Ser Gly Arg Gly Tyr Pro Asp Val Ser Thr Gln Gly Val Asn Phe Glu  
 450 455 460

# ES 2 694 765 T3

Ile Val Val Asp Gly Ser Ala Gly Thr Val Asp Gly Thr Ser Cys Ala  
 465 470 475 480  
 5  
 Ser Pro Thr Phe Ala Ser Val Ile Ala Leu Leu Asn Asp Gln Leu Val  
 485 490 495  
 10  
 Ala Ala Gly Lys Ser Thr Leu Gly Phe Leu Asn Pro Trp Leu Tyr Ser  
 500 505 510  
 15  
 Thr Ala Ala Ser Ala Leu Thr Asp Ile Thr Ser Gly Asp Asn Pro Gly  
 515 520 525  
 20  
 Cys Asn Thr Asn Gly Phe Pro Ala Val Thr Gly Trp Asp Ala Val Thr  
 530 535 540  
 25  
 Gly Leu Gly Thr Pro Asn Phe Ala Lys Leu Gln Ala Ala Ala Gly Leu  
 545 550 555 560  
 30  
 <210> 11  
 <211> 565  
 <212> PRT  
 <213> Phanerochaete chrysosporium  
 35  
 <400> 11  
 Met Val Ser Lys Leu Leu Val Leu Ser Ala Leu Phe Ser Leu Ala Phe  
 1 5 10 15  
 40  
 Ala Lys Pro Thr Ala Arg Ser Met Lys Val Arg Glu Ala Arg Glu Ser  
 20 25 30  
 45  
 Val Pro Gly Gly Tyr Val Arg Thr Gly Pro Ala Pro Ala Asp Lys Glu  
 35 40 45  
 50  
 Leu Lys Leu Arg Ile Ala Leu Val Gln Asn Asn Pro Asp Gly Leu Ile  
 50 55 60  
 55  
 Asp Ala Leu Tyr Ala Val Ser Thr Pro Gly Ser Ala Ser Tyr Gly Glu  
 65 70 75 80  
 60  
 His Leu Ser Lys Glu Glu Val Glu Lys Phe Val Ala Pro Thr Ala Gln  
 85 90 95  
 65  
 Ser Ser Glu Ala Val Asn Ala Trp Leu Glu Gln Val Gly Leu Asn Ala  
 100 105 110  
 70  
 Thr Thr Val Ser Pro Ala Gly Asp Trp Leu Ser Val Thr Ile Pro Val  
 115 120 125  
 75  
 Ser Lys Ala Asn Glu Ile Phe Asp Ala Asp Phe Ala Val Tyr Thr His  
 130 135 140  
 Phe Ala Thr Gly Lys Gln Ala Ile Arg Thr Met Ser Tyr Ser Ile Pro

# ES 2 694 765 T3

	145		150		155		160									
5	Ala	Ser	Leu	Glu	Gly	His	Leu	Asp	Phe	Val	His	Pro	Thr	Ile	Ser	Phe
					165					170					175	
10	Pro	Ser	Pro	Asn	Pro	Ile	Arg	Pro	Val	Ile	Ser	Thr	Pro	Leu	Gly	Gly
				180					185					190		
15	Leu	Glu	Gly	Arg	Ala	Ile	Glu	Pro	Leu	Ala	Ser	Cys	Ser	Thr	Ser	Ala
			195					200					205			
20	Val	Thr	Pro	Ala	Cys	Ile	Glu	Ser	Leu	Tyr	Gly	Ile	Pro	Thr	Thr	Lys
		210					215					220				
25	Ala	Thr	Gln	Ser	Ser	Asn	Thr	Leu	Gly	Val	Ser	Gly	Phe	Ile	Asp	Gln
	225					230					235				240	
30	Phe	Ala	Asn	Gln	Ala	Asp	Leu	Thr	Thr	Phe	Leu	Asn	Arg	Phe	Arg	Pro
					245					250					255	
35	Asp	Leu	Lys	Gly	Glu	Thr	Phe	Thr	Leu	Gln	Thr	Leu	Asp	Gly	Gly	Gln
			260						265					270		
40	Asn	Pro	Gln	Ser	Gly	Ser	Gln	Ala	Gly	Val	Glu	Ala	Asn	Leu	Asp	Ile
		275						280					285			
45	Gln	Tyr	Thr	Val	Gly	Ile	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Val	Thr	Phe	Ile	Ser
		290					295					300				
50	Val	Gly	Asp	Asn	Phe	Gln	Asp	Gly	Asp	Leu	Glu	Gly	Phe	Leu	Asp	Ile
	305					310					315				320	
55	Ile	Asn	Phe	Leu	Leu	Asn	Glu	Ser	Asn	Pro	Pro	His	Val	Leu	Thr	Thr
					325					330					335	
60	Ser	Tyr	Gly	Asp	Asn	Glu	Ser	Asp	Ile	Ser	Arg	Ser	Leu	Ala	Asn	Asn
				340					345					350		
65	Leu	Cys	Asn	Ala	Tyr	Ala	Gln	Leu	Gly	Ala	Arg	Gly	Thr	Ser	Ile	Leu
			355					360					365			
70	Phe	Ala	Ser	Gly	Asp	Gly	Gly	Val	Ser	Gly	Gly	Gln	Ser	Gln	Ser	Cys
		370					375					380				
75	Thr	Lys	Phe	Val	Pro	Thr	Phe	Pro	Ser	Gly	Cys	Pro	Phe	Met	Thr	Ser
	385					390					395				400	
80	Val	Gly	Ala	Thr	Gln	Leu	Thr	Ser	Ser	Ser	Gly	Gly	Glu	Thr	Ala	Ala
					405					410					415	
85	Ser	Phe	Ser	Ser	Gly	Gly	Phe	Ser	Asn	Tyr	Phe	Ala	Thr	Pro	Ser	Tyr
				420					425					430		

# ES 2 694 765 T3

5 Gln Ala Ser Val Val Ser Ser Tyr Ile Ser Ser Ile Gly Ser Thr Asn  
 435 440 445  
 Ser Gly Lys Tyr Asn Ala Ser Gly Arg Ala Phe Pro Asp Val Ala Ala  
 450 455 460  
 10 Ile Gly Thr Asn Leu Glu Ile Val Val Asp Gly Ser Phe Gly Thr Val  
 465 470 475 480  
 15 Asp Gly Thr Ser Cys Ser Ser Pro Val Phe Ala Ser Ala Ile Ala Leu  
 485 490 495  
 20 Ile Asn Asp Ala Leu Val Ala Gln Gly Lys Ser Pro Leu Gly Phe Leu  
 500 505 510  
 25 Asn Pro Phe Leu Tyr Ala Asn Pro Gly Ala Phe Asn Asp Ile Thr Ser  
 515 520 525  
 Gly Ser Asn Pro Gly Cys Asn Thr Asn Gly Phe Lys Ala Ala Lys Gly  
 530 535 540  
 30 Trp Asp Pro Val Thr Gly Leu Gly Thr Pro Asn Phe Ala Ala Leu Lys  
 545 550 555 560  
 35 Ala Ala Ala Gly Val  
 565  
 40 <210> 12  
 <211> 569  
 <212> PRT  
 <213> Postia placenta  
 45 <400> 12  
 Met Phe Leu Phe Pro Val Gly Leu Val Leu Ser Ala Leu Leu Thr Thr  
 1 5 10 15  
 50 Ala Ser Cys Thr Pro Ala Ser Thr Gly Leu His Val Leu Gly Arg Arg  
 20 25 30  
 55 Asp Ser Pro Pro Ser Gly Phe Thr Phe Val Gly Ala Ala Ser Pro Asp  
 35 40 45  
 60 Ser Val Leu Asn Leu Arg Ile Ala Leu Thr Gln Ser Asp Pro Ala Ala  
 50 55 60  
 Leu Glu Glu Ala Leu Tyr Asp Val Ser Thr Pro Ser Ser Ser Asn Tyr  
 65 70 75 80  
 65 Lys Gln Tyr Leu Ser Lys Glu Asp Val Ser Ala Phe Val Ala Pro Ser  
 85 90 95



# ES 2 694 765 T3

	Pro	Glu	Ala	Val	Ser	Ala	Val	Asn	Ala	Trp	Leu	Gln	Glu	Asn	Asp	Ile	
				100					105					110			
5	Thr	Ala	Lys	Thr	Leu	Thr	Pro	Ala	Gly	Asp	Trp	Val	Glu	Val	Gln	Ile	
			115					120					125				
10	Pro	Val	Ser	Lys	Ala	Asn	Glu	Ile	Phe	Asn	Ala	Asp	Tyr	Ser	Val	Phe	
		130					135					140					
15	Lys	His	Glu	Ser	Thr	Gly	Lys	Gln	Thr	Ile	Arg	Thr	Leu	Ser	Tyr	Ser	
	145					150					155					160	
	Ile	Pro	Glu	Glu	Leu	Thr	Asp	His	Val	Ala	Ile	Val	His	Pro	Thr	Thr	
					165					170					175		
20	Thr	Phe	Val	Phe	Pro	Thr	Tyr	Lys	Ala	Ser	Leu	Pro	Ala	Phe	Arg	Lys	
				180					185					190			
25	Val	Ser	Ser	Arg	Ala	Ala	Asn	Thr	Gly	Val	Ile	Asp	Thr	Ala	Ser	Ser	
			195					200					205				
30	Cys	Ala	Asp	Thr	Ile	Thr	Pro	Ala	Cys	Leu	Gln	Ser	Leu	Tyr	Asn	Leu	
	210						215					220					
35	Pro	Ser	Thr	Pro	Ala	Thr	Gln	Thr	Ser	Asn	Thr	Leu	Gly	Val	Ser	Gly	
	225					230					235					240	
	Phe	Ser	Asp	Gln	Tyr	Ala	Asn	Gln	Ala	Asp	Leu	Ala	Thr	Phe	Leu	Glu	
					245					250					255		
40	Thr	Tyr	Arg	Thr	Asp	Met	Ser	Ser	Asp	Thr	Thr	Phe	Thr	Val	Glu	Thr	
				260					265					270			
45	Leu	Asp	Gly	Gly	Ser	Asp	Pro	Gln	Asp	Gly	Ser	Asp	Ala	Gly	Asp	Glu	
			275					280					285				
50	Ala	Asn	Leu	Asp	Thr	Gln	Tyr	Thr	Val	Gly	Leu	Ala	Thr	Asp	Val	Pro	
	290						295					300					
55	Val	Val	Phe	Ile	Ser	Val	Gly	Glu	Asn	Thr	Asn	Asp	Gly	Asp	Leu	Asp	
	305					310					315					320	
	Gly	Phe	Leu	Asp	Ile	Ile	Asn	Tyr	Leu	Leu	Ala	Gln	Asp	Ala	Pro	Pro	
					325					330					335		
60	Gln	Val	Leu	Thr	Thr	Ser	Tyr	Gly	Ser	Ser	Glu	Ser	Asp	Val	Pro	Ile	
				340					345					350			
65	Ala	Met	Ala	Glu	Asn	Leu	Cys	Asn	Ala	Tyr	Ala	Gln	Leu	Gly	Ala	Arg	
			355					360					365				
	Gly	Val	Ser	Ile	Leu	Phe	Ala	Ser	Gly	Asp	Gly	Gly	Val	Ser	Gly	Pro	

# ES 2 694 765 T3

370 375 380  
 5 Gln Asp Ser Leu Phe Cys Trp Asp Phe Val Pro Thr Phe Pro Ser Gly  
 385 390 395 400  
 10 Cys Pro Tyr Leu Thr Ser Val Gly Ala Thr Thr Gly Ile Ser Pro Glu  
 405 410 415  
 15 Thr Ala Ala Asp Phe Ser Ser Gly Gly Phe Ser Asn Tyr Trp Gly Val  
 420 425 430  
 20 Pro Ser Tyr Gln Gln Ser Ala Val Ser Gly Tyr Leu Ser Tyr Leu Gly  
 435 440 445  
 25 Asp Thr Tyr Ser Gly Arg Tyr Asn Ala Ser Gly Arg Gly Tyr Pro Asp  
 450 455 460  
 30 Val Ser Ala Gln Gly Glu Asn Phe Asn Ile Val Leu Asp Gln Asp Val  
 465 470 475 480  
 35 Glu Ser Val Ser Gly Thr Ser Cys Ala Ser Pro Thr Phe Ala Ser Val  
 485 490 495  
 40 Ile Ala Leu Leu Asn Asp Glu Leu Ile Ala Ala Gly Lys Ser Pro Leu  
 500 505 510  
 45 Gly Phe Leu Asn Pro Trp Leu Tyr Ser Thr Ala Ala Ser Ser Leu Asn  
 515 520 525  
 50 Asp Val Thr Ser Gly Asp Asn Pro Gly Cys Phe Ser Asp Gly Phe Ser  
 530 535 540  
 55 Ala Thr Thr Gly Trp Asp Pro Val Thr Gly Leu Gly Thr Pro Asp Tyr  
 545 550 555 560  
 60 Thr Ser Leu Arg Thr Ala Ala Gly Leu  
 565  
 <210> 13  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 55 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador 597  
 60 <400> 13  
 tagggatcct caccgatgggc gccaccagct 30  
 65 <210> 14  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>

# ES 2 694 765 T3

```

<223>  Cebador 598

<400>  14
caggccgacc gcggtgag                                18

5

<210>  15
<211>  2087
<212>  ADN
10 <213>  Trametes cf versicolor

<220>
<221>  CDS
15 <222>  (1)..(258)

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

<220>
<221>  CDS
<222>  (312)..(577)

25 <220>
<221>  CDS
<222>  (634)..(853)

30 <220>
<221>  mat_peptide
<222>  (707)..(2084)

<220>
<221>  CDS
35 <222>  (912)..(1022)

<220>
<221>  CDS
40 <222>  (1077)..(1276)

<220>
<221>  CDS
<222>  (1332)..(1469)

45 <220>
<221>  CDS
<222>  (1531)..(1978)

50 <220>
<221>  CDS
<222>  (2031)..(2084)

<400>  15
55 atg gtc gcc acc ggc ttg ctc gtt gcc tcc ctg ttc acg ctt gtc      45
   Met Val Ala Thr Gly Leu Leu Val Ala Ser Leu Phe Thr Leu Val
                                -195                                -190                                -185

ctc ggc act ccg acg gct cgc aac ctc aag ctg cat gag tct cgc      90
Leu Gly Thr Pro Thr Ala Arg Asn Leu Lys Leu His Glu Ser Arg
                                -180                                -175                                -170

60 gag gag atc ccc gcc ggc ttc tcg ctg agc ggc gcc gcc tcg ccc      135
   Glu Glu Ile Pro Ala Gly Phe Ser Leu Ser Gly Ala Ala Ser Pro
                                -165                                -160                                -155

65 gac acg aca ctg aag ctc cgc ctc gcg ctc gtg cag agc aac ttc      180
   Asp Thr Thr Leu Lys Leu Arg Leu Ala Leu Val Gln Ser Asn Phe
                                -150                                -145                                -140

```

# ES 2 694 765 T3

	gcc gag ctc gag gac aag ctc tac gac gtc agc acc ccg tcg agc	225
	Ala Glu Leu Glu Asp Lys Leu Tyr Asp Val Ser Thr Pro Ser Ser	
	-135 -130 -125	
5	gcg aac tac ggc cag cac ctc tcc aag gag gag gtacagctcg	268
	Ala Asn Tyr Gly Gln His Leu Ser Lys Glu Glu	
	-120 -115	
10	cctcccatgt ggctttgcgc agtttactca cgagcatttg cag gtt gag caa ctc	323
	Val Glu Gln Leu	
	-110	
	gtc gct cct agc gcc gag tcg gtc aac gcc gtc aac gcc tgg ctc act	371
	Val Ala Pro Ser Ala Glu Ser Val Asn Ala Val Asn Ala Trp Leu Thr	
15	-105 -100 -95	
	gag aac ggt ctc act gcg cag acc atc tcg ccc gcc ggc gac tgg ttg	419
	Glu Asn Gly Leu Thr Ala Gln Thr Ile Ser Pro Ala Gly Asp Trp Leu	
	-90 -85 -80	
20	gcg ttc gag gtg ccc gtc agc aag gcc aac gag ctc ttc gat gcc gac	467
	Ala Phe Glu Val Pro Val Ser Lys Ala Asn Glu Leu Phe Asp Ala Asp	
	-75 -70 -65	
25	ttc tcc gtg ttc acg cac gac gag tct ggc ctc aag gct gtc cgc acc	515
	Phe Ser Val Phe Thr His Asp Glu Ser Gly Leu Lys Ala Val Arg Thr	
	-60 -55 -50	
30	ctg gcg tac tcc atc ccc gct gag ctc cag ggg cac ctt gac ctc gtc	563
	Leu Ala Tyr Ser Ile Pro Ala Glu Leu Gln Gly His Leu Asp Leu Val	
	-45 -40 -35 -30	
	cac ccc acg atc ac gtcagtcata ctgcttgcgc gcaattacca ccagtgtga	617
	His Pro Thr Ile Thr	
35	-25	
	cgacttcttg tgacag g ttc ccg aac ccg aac tcg cac ctg ccc gtt gtg	667
	Phe Pro Asn Pro Asn Ser His Leu Pro Val Val	
	-20 -15	
40	cgc tcg ccc gtg aag ccc gtc cag aac ctc acc tcg cgt gcc gtt ccg	715
	Arg Ser Pro Val Lys Pro Val Gln Asn Leu Thr Ser Arg Ala Val Pro	
	-10 -5 -1 1	
45	gct tcg tgc gcc agc acc atc acg cct gcg tgc ctg cag gct ctc tac	763
	Ala Ser Cys Ala Ser Thr Ile Thr Pro Ala Cys Leu Gln Ala Leu Tyr	
	5 10 15	
50	ggc atc ccc acc acc aag gcc act cag tca tcg aac aag ctc gcc gtc	811
	Gly Ile Pro Thr Thr Lys Ala Thr Gln Ser Ser Asn Lys Leu Ala Val	
	20 25 30 35	
	agc ggc ttc atc gac cag ttc gcc aac tcc gcg gac ttg aag	853
	Ser Gly Phe Ile Asp Gln Phe Ala Asn Ser Ala Asp Leu Lys	
55	40 45	
	gtgagcgtcc tagcgccccg gaaatcggat tcggtgctga tcattctgga ccttctag	911
	aca ttc ctc ggc aag ttc cgc acc gac atc tcg tcc tcg acg acc ttc	959
	Thr Phe Leu Gly Lys Phe Arg Thr Asp Ile Ser Ser Ser Thr Thr Phe	
60	50 55 60 65	
	acc ctc cag acc ctc gac ggc gga tcc aac agc cag tcc agc agc cag	1007
	Thr Leu Gln Thr Leu Asp Gly Gly Ser Asn Ser Gln Ser Ser Ser Gln	
65	70 75 80	
	gct ggt gtt gag gct gtaagtggcg ggctatgctg ctgtacagag acaggcgctg	1062
	Ala Gly Val Glu Ala	
	85	

# ES 2 694 765 T3

	acagcttgac atag aac ctg gac atc cag tac acc gtc ggc ctc gcc tcg	1112
	Asn Leu Asp Ile Gln Tyr Thr Val Gly Leu Ala Ser	
5	90 95	
	gcc gtc cct acc atc ttc atc tcc gtt ggc gac gac ttc cag gac ggc	1160
	Ala Val Pro Thr Ile Phe Ile Ser Val Gly Asp Asp Phe Gln Asp Gly	
	100 105 110	
10	gac ctc gag ggc ttc ctc gac atc atc aac ttc ctc ctc aat gag agc	1208
	Asp Leu Glu Gly Phe Leu Asp Ile Ile Asn Phe Leu Leu Asn Glu Ser	
	115 120 125 130	
15	gcg ccc ccg cag gtg ctc acg acc agc tac ggc cag aat gag aac acg	1256
	Ala Pro Pro Gln Val Leu Thr Thr Ser Tyr Gly Gln Asn Glu Asn Thr	
	135 140 145	
20	atc tcc gcc aag ctt gcc aa gtacgtccgc atgcgccacc cgcaatgcgc	1306
	Ile Ser Ala Lys Leu Ala Asn	
	150	
	tattcaactga ccttcgtctg tgcag c caa ctg tgc aac gca tac gcc cag ctc	1359
	Gln Leu Cys Asn Ala Tyr Ala Gln Leu	
	155 160	
25	ggc gcg cgt ggc acc tcc atc ctc ttc gcc tcc ggt gac ggt ggt gtt	1407
	Gly Ala Arg Gly Thr Ser Ile Leu Phe Ala Ser Gly Asp Gly Gly Val	
	165 170 175	
30	tcc gcc tcg cag tcc tct agc tgc tcc aag ttt gtc ccg acc ttc ccc	1455
	Ser Gly Ser Gln Ser Ser Ser Cys Ser Lys Phe Val Pro Thr Phe Pro	
	180 185 190	
35	tcg gcc tgc ccc tt gtacgtcaact ccgcccaacc tcatccgctt gtagtactaa	1509
	Ser Gly Cys Pro Phe	
	195	
40	catggcgccc actcaccaca g c atg acc tcc gtc ggc gcg acg cag ggc atc	1561
	Met Thr Ser Val Gly Ala Thr Gln Gly Ile	
	200 205	
	aac ccg gag acc gcc gcc gac ttc tcc tcc ggc ggc ttc tcg aac gtc	1609
	Asn Pro Glu Thr Ala Ala Asp Phe Ser Ser Gly Gly Phe Ser Asn Val	
	210 215 220 225	
45	ttc gcc cgc ccg tcg tac cag tcc acc gcc gtc agc agc tac ctc acc	1657
	Phe Ala Arg Pro Ser Tyr Gln Ser Thr Ala Val Ser Ser Tyr Leu Thr	
	230 235 240	
50	gcg ctc ggc agc acc aac tcg ggc aag ttc aac acc tcc ggc cgc gca	1705
	Ala Leu Gly Ser Thr Asn Ser Gly Lys Phe Asn Thr Ser Gly Arg Ala	
	245 250 255	
55	ttc ccc gac atc gcg acc cag ggc gtc gac ttt gag atc gtc gtc agc	1753
	Phe Pro Asp Ile Ala Thr Gln Gly Val Asp Phe Glu Ile Val Val Ser	
	260 265 270	
60	ggc cgc acc gag ggt gtc gac ggc acg agc tgt gcc agc ccg acg ctc	1801
	Gly Arg Thr Glu Gly Val Asp Gly Thr Ser Cys Ala Ser Pro Thr Leu	
	275 280 285	
	gcc gcg atc atc tcg ctc ctg aac gac cgc ctc atc gcc gcc ggc aag	1849
	Ala Ala Ile Ile Ser Leu Leu Asn Asp Arg Leu Ile Ala Ala Gly Lys	
	290 295 300 305	
65	agc ccc ctt ggc ttc ctc aac ccc ttc ttg tac tcg gcg gcg ggc act	1897
	Ser Pro Leu Gly Phe Leu Asn Pro Phe Leu Tyr Ser Ala Ala Gly Thr	
	310 315 320	

# ES 2 694 765 T3

	gct gcg ctc act gac atc acg tcg ggc tcg aac ccg ggc tgc aac acc	1945
	Ala Ala Leu Thr Asp Ile Thr Ser Gly Ser Asn Pro Gly Cys Asn Thr	
	325 330 335	
5	aac ggc ttc ccc gcg aag gct ggc tgg gac ccg gtgcgttcct ttctccgtgg	1998
	Asn Gly Phe Pro Ala Lys Ala Gly Trp Asp Pro	
	340 345	
10	cgcgcgcgaa acttggtactg acggcggttg ag gtc acc ggt ctt ggc acg ccc	2051
	Val Thr Gly Leu Gly Thr Pro	
	350 355	
15	aac ttc gcc aag ctg ctc acc gct gtt ggc ctg taa	2087
	Asn Phe Ala Lys Leu Leu Thr Ala Val Gly Leu	
	360 365	
20	<210> 16	
	<211> 565	
	<212> PRT	
	<213> Trametes cf versicolor	
	<400> 16	
25	Met Val Ala Thr Gly Leu Leu Val Ala Ser Leu Phe Thr Leu Val	
	-195 -190 -185	
30	Leu Gly Thr Pro Thr Ala Arg Asn Leu Lys Leu His Glu Ser Arg	
	-180 -175 -170	
35	Glu Glu Ile Pro Ala Gly Phe Ser Leu Ser Gly Ala Ala Ser Pro	
	-165 -160 -155	
40	Asp Thr Thr Leu Lys Leu Arg Leu Ala Leu Val Gln Ser Asn Phe	
	-150 -145 -140	
45	Ala Glu Leu Glu Asp Lys Leu Tyr Asp Val Ser Thr Pro Ser Ser	
	-135 -130 -125	
50	Ala Asn Tyr Gly Gln His Leu Ser Lys Glu Glu Val Glu Gln Leu	
	-120 -115 -110	
55	Val Ala Pro Ser Ala Glu Ser Val Asn Ala Val Asn Ala Trp Leu Thr	
	-105 -100 -95	
60	Glu Asn Gly Leu Thr Ala Gln Thr Ile Ser Pro Ala Gly Asp Trp Leu	
	-90 -85 -80	
65	Ala Phe Glu Val Pro Val Ser Lys Ala Asn Glu Leu Phe Asp Ala Asp	
	-75 -70 -65	
70	Phe Ser Val Phe Thr His Asp Glu Ser Gly Leu Lys Ala Val Arg Thr	
	-60 -55 -50	
75	Leu Ala Tyr Ser Ile Pro Ala Glu Leu Gln Gly His Leu Asp Leu Val	
	-45 -40 -35 -30	
80	His Pro Thr Ile Thr Phe Pro Asn Pro Asn Ser His Leu Pro Val Val	

# ES 2 694 765 T3

				-25					-20					-15			
5	Arg	Ser	Pro	Val	Lys	Pro	Val	Gln	Asn	Leu	Thr	Ser	Arg	Ala	Val	Pro	
				-10					-5				-1	1			
10	Ala	Ser	Cys	Ala	Ser	Thr	Ile	Thr	Pro	Ala	Cys	Leu	Gln	Ala	Leu	Tyr	
		5					10					15					
15	Gly	Ile	Pro	Thr	Thr	Lys	Ala	Thr	Gln	Ser	Ser	Asn	Lys	Leu	Ala	Val	
	20					25					30					35	
20	Ser	Gly	Phe	Ile	Asp	Gln	Phe	Ala	Asn	Ser	Ala	Asp	Leu	Lys	Thr	Phe	
					40					45					50		
25	Leu	Gly	Lys	Phe	Arg	Thr	Asp	Ile	Ser	Ser	Ser	Thr	Thr	Phe	Thr	Leu	
				55					60					65			
30	Gln	Thr	Leu	Asp	Gly	Gly	Ser	Asn	Ser	Gln	Ser	Ser	Ser	Gln	Ala	Gly	
			70					75					80				
35	Val	Glu	Ala	Asn	Leu	Asp	Ile	Gln	Tyr	Thr	Val	Gly	Leu	Ala	Ser	Ala	
		85					90					95					
40	Val	Pro	Thr	Ile	Phe	Ile	Ser	Val	Gly	Asp	Asp	Phe	Gln	Asp	Gly	Asp	
	100					105					110					115	
45	Leu	Glu	Gly	Phe	Leu	Asp	Ile	Ile	Asn	Phe	Leu	Leu	Asn	Glu	Ser	Ala	
					120					125						130	
50	Pro	Pro	Gln	Val	Leu	Thr	Thr	Ser	Tyr	Gly	Gln	Asn	Glu	Asn	Thr	Ile	
				135					140					145			
55	Ser	Ala	Lys	Leu	Ala	Asn	Gln	Leu	Cys	Asn	Ala	Tyr	Ala	Gln	Leu	Gly	
			150					155					160				
60	Ala	Arg	Gly	Thr	Ser	Ile	Leu	Phe	Ala	Ser	Gly	Asp	Gly	Gly	Val	Ser	
		165					170					175					
65	Gly	Ser	Gln	Ser	Ser	Ser	Cys	Ser	Lys	Phe	Val	Pro	Thr	Phe	Pro	Ser	
	180					185					190					195	
70	Gly	Cys	Pro	Phe	Met	Thr	Ser	Val	Gly	Ala	Thr	Gln	Gly	Ile	Asn	Pro	
					200					205					210		
75	Glu	Thr	Ala	Ala	Asp	Phe	Ser	Ser	Gly	Gly	Phe	Ser	Asn	Val	Phe	Ala	
				215					220					225			
80	Arg	Pro	Ser	Tyr	Gln	Ser	Thr	Ala	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Thr	Ala	Leu	
			230					235					240				
85	Gly	Ser	Thr	Asn	Ser	Gly	Lys	Phe	Asn	Thr	Ser	Gly	Arg	Ala	Phe	Pro	
		245					250					255					

# ES 2 694 765 T3

5	Asp Ile Ala Thr Gln Gly Val Asp Phe Glu Ile Val Val Ser Gly Arg 260 265 270 275	
10	Thr Glu Gly Val Asp Gly Thr Ser Cys Ala Ser Pro Thr Leu Ala Ala 280 285 290	
15	Ile Ile Ser Leu Leu Asn Asp Arg Leu Ile Ala Ala Gly Lys Ser Pro 295 300 305	
20	Leu Gly Phe Leu Asn Pro Phe Leu Tyr Ser Ala Ala Gly Thr Ala Ala 310 315 320	
25	Leu Thr Asp Ile Thr Ser Gly Ser Asn Pro Gly Cys Asn Thr Asn Gly 325 330 335	
30	Phe Pro Ala Lys Ala Gly Trp Asp Pro Val Thr Gly Leu Gly Thr Pro 340 345 350 355	
35	Asn Phe Ala Lys Leu Leu Thr Ala Val Gly Leu 360 365	
40	<210> 17 <211> 1698 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <221> sig_peptide <222> (1)..(51)	
50	<220> <221> mat_peptide <222> (598)..(1695)	
55	atg gtg gca act ggc ttg ttg gtc gca tcc ttg ttc act ttg gtg Met Val Ala Thr Gly Leu Leu Val Ala Ser Leu Phe Thr Leu Val -195 -190 -185	45
60	ctc ggc act ccc acc gca cgg aac ctc aag ttg cac gag tcc agg Leu Gly Thr Pro Thr Ala Arg Asn Leu Lys Leu His Glu Ser Arg -180 -175 -170	90
65	gaa gag atc cct gca gga ttc tcg ttg tcc gga gca gcg tcg cct Glu Glu Ile Pro Ala Gly Phe Ser Leu Ser Gly Ala Ala Ser Pro -165 -160 -155	135
	gat aca acc ttg aag ttg cgg ttg gcg ttg gtg cag tcc aac ttc Asp Thr Thr Leu Lys Leu Arg Leu Ala Leu Val Gln Ser Asn Phe -150 -145 -140	180



# ES 2 694 765 T3

	gcg gag ctc gaa gac aag ctc tat gat gtc tcc acc ccg tcc tcg	225
	Ala Glu Leu Glu Asp Lys Leu Tyr Asp Val Ser Thr Pro Ser Ser	
	-135 -130 -125	
5	gca aac tat gga cag cac ctc tcc aaa gag gag gtc gag cag ttg	270
	Ala Asn Tyr Gly Gln His Leu Ser Lys Glu Glu Val Glu Gln Leu	
	-120 -115 -110	
10	gtg gca ccg tcg gca gag tcg gtg aac gcg gtc aac gcc tgg ttg acc	318
	Val Ala Pro Ser Ala Glu Ser Val Asn Ala Val Asn Ala Trp Leu Thr	
	-105 -100 -95	
15	gaa aac gga ttg aca gca cag acc att tcg cct gca ggc gat tgg ttg	366
	Glu Asn Gly Leu Thr Ala Gln Thr Ile Ser Pro Ala Gly Asp Trp Leu	
	-90 -85 -80	
20	gcg ttc gag gtc cct gtc tcg aag gcc aac gaa ctc ttc gac gca gac	414
	Ala Phe Glu Val Pro Val Ser Lys Ala Asn Glu Leu Phe Asp Ala Asp	
	-75 -70 -65	
25	ttc tcg gtc ttc acc cac gac gag tcc gga ctc aag gcg gtc cga act	462
	Phe Ser Val Phe Thr His Asp Glu Ser Gly Leu Lys Ala Val Arg Thr	
	-60 -55 -50	
30	ctc gcg tat tcg att cct gcg gag ttg cag ggt cat ctc gat ttg gtc	510
	Leu Ala Tyr Ser Ile Pro Ala Glu Leu Gln Gly His Leu Asp Leu Val	
	-45 -40 -35 -30	
35	cac ccc acc atc acg ttc ccc aac ccc aac tcc cat ttg cct gtc gtg	558
	His Pro Thr Ile Thr Phe Pro Asn Pro Asn Ser His Leu Pro Val Val	
	-25 -20 -15	
40	cgg tcc cct gtc aaa ccg gtc cag aac ctc aca tcc cgt gcc gtc cct	606
	Arg Ser Pro Val Lys Pro Val Gln Asn Leu Thr Ser Arg Ala Val Pro	
	-10 -5 -1 1	
45	gcc tcc tgt gcg tcg acg atc acc cct gca tgt ttg cag gca ctc tac	654
	Ala Ser Cys Ala Ser Thr Ile Thr Pro Ala Cys Leu Gln Ala Leu Tyr	
	5 10 15	
50	ggt atc ccc act acc aag gca acc cag tcg tcg aac aag ttg gcc gtc	702
	Gly Ile Pro Thr Thr Lys Ala Thr Gln Ser Ser Asn Lys Leu Ala Val	
	20 25 30 35	
55	tcc ggt ttc atc gat cag ttc gcg aac tcc gca gat ttg aaa aca ttc	750
	Ser Gly Phe Ile Asp Gln Phe Ala Asn Ser Ala Asp Leu Lys Thr Phe	
	40 45 50	
60	ttg gga aag ttc cgg acc gat atc tcg tcg tcg acg acc ttc acc ctc	798
	Leu Gly Lys Phe Arg Thr Asp Ile Ser Ser Ser Thr Thr Phe Thr Leu	
	55 60 65	
65	cag aca ctc gat gga ggc tcc aac tcg cag tcg tcc tcg cag gca ggt	846
	Gln Thr Leu Asp Gly Gly Ser Asn Ser Gln Ser Ser Ser Gln Ala Gly	
	70 75 80	
70	gtg gag gcg aac ttg gac att cag tat aca gtc ggc ctc gca tcg gca	894
	Val Glu Ala Asn Leu Asp Ile Gln Tyr Thr Val Gly Leu Ala Ser Ala	
	85 90 95	
75	gtg ccc act atc ttc atc tcc gtg ggt gac gat ttc cag gac gga gac	942
	Val Pro Thr Ile Phe Ile Ser Val Gly Asp Asp Phe Gln Asp Gly Asp	
	100 105 110 115	
80	ctc gaa ggt ttc ctc gac att atc aac ttc ctc ctc aac gaa tcc gca	990
	Leu Glu Gly Phe Leu Asp Ile Ile Asn Phe Leu Leu Asn Glu Ser Ala	
	120 125 130	
85	ccc cct cag gtc ttg acg act tcc tat ggc cag aac gag aac aca atc	1038

# ES 2 694 765 T3

	Pro	Pro	Gln	Val	Leu	Thr	Thr	Ser	Tyr	Gly	Gln	Asn	Glu	Asn	Thr	Ile	
				135					140					145			
5	tcc	gcg	aag	ctc	gcc	aac	cag	ctc	tgt	aac	gca	tac	gcc	cag	ctc	gga	1086
	Ser	Ala	Lys	Leu	Ala	Asn	Gln	Leu	Cys	Asn	Ala	Tyr	Ala	Gln	Leu	Gly	
			150					155					160				
10	gca	cgt	gga	acg	tcc	atc	ttg	ttc	gca	tcc	gga	gat	gga	ggc	gtg	tcg	1134
	Ala	Arg	Gly	Thr	Ser	Ile	Leu	Phe	Ala	Ser	Gly	Asp	Gly	Gly	Val	Ser	
			165				170					175					
15	ggc	tcg	cag	tcc	tcg	tcg	tgt	tcc	aaa	ttc	gtc	ccc	aca	ttc	cct	tcg	1182
	Gly	Ser	Gln	Ser	Ser	Ser	Cys	Ser	Lys	Phe	Val	Pro	Thr	Phe	Pro	Ser	
						185					190					195	
	ggt	tgt	ccg	ttc	atg	acc	tcg	gtc	gga	gcc	aca	cag	ggc	att	aac	ccg	1230
	Gly	Cys	Pro	Phe	Met	Thr	Ser	Val	Gly	Ala	Thr	Gln	Gly	Ile	Asn	Pro	
					200				205					210			
20	gag	acc	gca	gcc	gat	ttc	tcg	tcc	gga	gga	ttc	tcc	aac	gtg	ttc	gca	1278
	Glu	Thr	Ala	Ala	Asp	Phe	Ser	Ser	Gly	Gly	Phe	Ser	Asn	Val	Phe	Ala	
				215					220					225			
25	cgg	cct	tcg	tac	cag	tcc	act	gca	gtc	tcg	tcg	tac	ctc	act	gcc	ctc	1326
	Arg	Pro	Ser	Tyr	Gln	Ser	Thr	Ala	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Thr	Ala	Leu	
			230					235					240				
30	ggc	tcc	acc	aac	tcg	ggc	aaa	ttc	aac	acc	tcg	ggc	agg	gcc	ttc	ccg	1374
	Gly	Ser	Thr	Asn	Ser	Gly	Lys	Phe	Asn	Thr	Ser	Gly	Arg	Ala	Phe	Pro	
		245					250					255					
35	gat	atc	gcg	acg	cag	ggc	gtc	gat	ttc	gag	atc	gtc	gtc	tcc	ggt	agg	1422
	Asp	Ile	Ala	Thr	Gln	Gly	Val	Asp	Phe	Glu	Ile	Val	Val	Ser	Gly	Arg	
						265					270				275		
	act	gag	ggc	gtc	gac	gga	acg	tcg	tgt	gcc	tcc	ccc	acg	ctc	gca	gca	1470
	Thr	Glu	Gly	Val	Asp	Gly	Thr	Ser	Cys	Ala	Ser	Pro	Thr	Leu	Ala	Ala	
					280					285				290			
40	atc	atc	tcg	ctc	ctc	aac	gac	agg	ctc	att	gca	gca	ggc	aaa	tcc	cct	1518
	Ile	Ile	Ser	Leu	Leu	Asn	Asp	Arg	Leu	Ile	Ala	Ala	Gly	Lys	Ser	Pro	
				295					300					305			
45	ttg	ggc	ttc	ctc	aac	ccc	ttc	ttg	tac	tcg	gca	gcg	gga	aca	gcc	gca	1566
	Leu	Gly	Phe	Leu	Asn	Pro	Phe	Leu	Tyr	Ser	Ala	Ala	Gly	Thr	Ala	Ala	
			310					315					320				
50	ttg	acc	gac	atc	acg	tcc	ggc	tcg	aac	cct	gga	tgt	aac	acg	aac	gga	1614
	Leu	Thr	Asp	Ile	Thr	Ser	Gly	Ser	Asn	Pro	Gly	Cys	Asn	Thr	Asn	Gly	
			325				330					335					
55	ttc	cct	gca	aag	gca	ggt	tgg	gac	ccc	gtc	aca	ggc	ctc	ggc	act	ccc	1662
	Phe	Pro	Ala	Lys	Ala	Gly	Trp	Asp	Pro	Val	Thr	Gly	Leu	Gly	Thr	Pro	
						345					350					355	
	aac	ttc	gcc	aag	ctc	ctc	aca	gcg	gtc	ggc	ttg	taa					1698
	Asn	Phe	Ala	Lys	Leu	Leu	Thr	Ala	Val	Gly	Leu						
					360					365							
60	<210>	18															
	<211>	565															
	<212>	PRT															
	<213>	Secuencia artificial															
65	<220>																
	<223>	Constructo sintético															
	<400>	18															

# ES 2 694 765 T3

Met Val Ala Thr Gly Leu Leu Val Ala Ser Leu Phe Thr Leu Val  
 -195 -190 -185  
 5  
 Leu Gly Thr Pro Thr Ala Arg Asn Leu Lys Leu His Glu Ser Arg  
 -180 -175 -170  
 10  
 Glu Glu Ile Pro Ala Gly Phe Ser Leu Ser Gly Ala Ala Ser Pro  
 -165 -160 -155  
 15  
 Asp Thr Thr Leu Lys Leu Arg Leu Ala Leu Val Gln Ser Asn Phe  
 -150 -145 -140  
 20  
 Ala Glu Leu Glu Asp Lys Leu Tyr Asp Val Ser Thr Pro Ser Ser  
 -135 -130 -125  
 25  
 Ala Asn Tyr Gly Gln His Leu Ser Lys Glu Glu Val Glu Gln Leu  
 -120 -115 -110  
 30  
 Val Ala Pro Ser Ala Glu Ser Val Asn Ala Val Asn Ala Trp Leu Thr  
 -105 -100 -95  
 35  
 Glu Asn Gly Leu Thr Ala Gln Thr Ile Ser Pro Ala Gly Asp Trp Leu  
 -90 -85 -80  
 40  
 Ala Phe Glu Val Pro Val Ser Lys Ala Asn Glu Leu Phe Asp Ala Asp  
 -75 -70 -65  
 45  
 Phe Ser Val Phe Thr His Asp Glu Ser Gly Leu Lys Ala Val Arg Thr  
 -60 -55 -50  
 50  
 Leu Ala Tyr Ser Ile Pro Ala Glu Leu Gln Gly His Leu Asp Leu Val  
 -45 -40 -35 -30  
 55  
 His Pro Thr Ile Thr Phe Pro Asn Pro Asn Ser His Leu Pro Val Val  
 -25 -20 -15  
 60  
 Arg Ser Pro Val Lys Pro Val Gln Asn Leu Thr Ser Arg Ala Val Pro  
 -10 -5 -1 1  
 65  
 Ala Ser Cys Ala Ser Thr Ile Thr Pro Ala Cys Leu Gln Ala Leu Tyr  
 5 10 15  
 Gly Ile Pro Thr Thr Lys Ala Thr Gln Ser Ser Asn Lys Leu Ala Val  
 20 25 30 35  
 Ser Gly Phe Ile Asp Gln Phe Ala Asn Ser Ala Asp Leu Lys Thr Phe  
 40 45 50  
 65  
 Leu Gly Lys Phe Arg Thr Asp Ile Ser Ser Ser Thr Thr Phe Thr Leu  
 55 60 65

# ES 2 694 765 T3

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

# ES 2 694 765 T3

	340		345		350		355
5	Asn Phe Ala Lys	Leu Leu Thr Ala Val	Gly Leu				
		360		365			
10	<210> 19						
	<211> 366						
	<212> PRT						
	<213> Trametes cf versicolor						
15	<220>						
	<221> mat_peptide						
	<222> (1)..(366)						
	<400> 19						
20	Ala Val Pro Ala	Ser Cys Ala Ser Thr	Ile Thr Pro Ala Cys Leu Gln				
	1	5	10	15			
25	Ala Leu Tyr Gly	Ile Pro Thr Thr	Lys Ala Thr Gln Ser Ser Asn Lys				
	20		25	30			
30	Leu Ala Val Ser	Gly Phe Ile Asp Gln Phe Ala Asn Ser Ala Asp Leu					
	35	40	45				
35	Lys Thr Phe Leu Gly	Lys Phe Arg Thr Asp Ile Ser Ser Ser Thr Thr					
	50	55	60				
40	Phe Thr Leu Gln Thr	Leu Asp Gly Gly Ser Asn Ser Gln Ser Ser Ser					
	65	70	75	80			
45	Gln Ala Gly Val	Glu Ala Asn Leu Asp Ile Gln Tyr Thr Val Gly Leu					
		85	90	95			
50	Ala Ser Ala Val	Pro Thr Ile Phe Ile Ser Val Gly Asp Asp Phe Gln					
		100	105	110			
55	Asp Gly Asp Leu Glu Gly	Phe Leu Asp Ile Ile Asn Phe Leu Leu Asn					
		115	120	125			
60	Glu Ser Ala Pro Pro	Gln Val Leu Thr Thr Ser Tyr Gly Gln Asn Glu					
		130	135	140			
65	Asn Thr Ile Ser Ala	Lys Leu Ala Asn Gln Leu Cys Asn Ala Tyr Ala					
		145	150	155	160		
70	Gln Leu Gly Ala	Arg Gly Thr Ser Ile Leu Phe Ala Ser Gly Asp Gly					
		165	170	175			
75	Gly Val Ser Gly	Ser Gln Ser Ser Ser Cys Ser Lys Phe Val Pro Thr					
		180	185	190			
80	Phe Pro Ser Gly	Cys Pro Phe Met Thr Ser Val Gly Ala Thr Gln Gly					
		195	200	205			

# ES 2 694 765 T3

```

5      Ile Asn Pro Glu Thr Ala Ala Asp Phe Ser Ser Gly Gly Phe Ser Asn
      210                215                220

10     Val Phe Ala Arg Pro Ser Tyr Gln Ser Thr Ala Val Ser Ser Tyr Leu
      225                230                235                240

15     Thr Ala Leu Gly Ser Thr Asn Ser Gly Lys Phe Asn Thr Ser Gly Arg
      245                250                255

20     Ala Phe Pro Asp Ile Ala Thr Gln Gly Val Asp Phe Glu Ile Val Val
      260                265                270

25     Ser Gly Arg Thr Glu Gly Val Asp Gly Thr Ser Cys Ala Ser Pro Thr
      275                280                285

30     Leu Ala Ala Ile Ile Ser Leu Leu Asn Asp Arg Leu Ile Ala Ala Gly
      290                295                300

35     Lys Ser Pro Leu Gly Phe Leu Asn Pro Phe Leu Tyr Ser Ala Ala Gly
      305                310                315                320

40     Thr Ala Ala Leu Thr Asp Ile Thr Ser Gly Ser Asn Pro Gly Cys Asn
      325                330                335

45     Thr Asn Gly Phe Pro Ala Lys Ala Gly Trp Asp Pro Val Thr Gly Leu
      340                345                350

50     Gly Thr Pro Asn Phe Ala Lys Leu Leu Thr Ala Val Gly Leu
      355                360                365

45     <210> 20
      <211> 2088
      <212> ADN
      <213> Trametes versicolor

50     <220>
      <221> CDS
      <222> (1)..(258)

55     <220>
      <221> sig_peptide
      <222> (1)..(51)

60     <220>
      <221> CDS
      <222> (311)..(576)

65     <220>
      <221> CDS
      <222> (633)..(852)

      <220>
      <221> mat_peptide
      <222> (706)..(2085)

      <220>

```

# ES 2 694 765 T3

```

<221> CDS
<222> (914)..(1024)

<220>
5 <221> CDS
  <222> (1080)..(1279)

<220>
10 <221> CDS
    <222> (1333)..(1470)

<220>
15 <221> CDS
    <222> (1532)..(1979)

<220>
20 <221> CDS
    <222> (2032)..(2085)

<400> 20

atg gtc gcc acc agc ttg ctc gtt gcc tcc ctg ttc acg ctt gtc 45
Met Val Ala Thr Ser Leu Leu Val Ala Ser Leu Phe Thr Leu Val
-195 -190 -185

25 ctc ggc acc ccg acg gct cgc aac ctc aag ctg cat gag tct cgc 90
Leu Gly Thr Pro Thr Ala Arg Asn Leu Lys Leu His Glu Ser Arg
-180 -175 -170

30 gag gag atc ccc gcc ggc ttc tcg ctg agc ggc gcc gcc tcg ccc 135
Glu Glu Ile Pro Ala Gly Phe Ser Leu Ser Gly Ala Ala Ser Pro
-165 -160 -155

35 gac acg acg ctg aag ctc cgc ctc gcg ctc gtt cag agc aac ttc 180
Asp Thr Thr Leu Lys Leu Arg Leu Ala Leu Val Gln Ser Asn Phe
-150 -145 -140

gcc gag ctt gag gac aag ctc tac gac gtc agc acc ccg tcg agc 225
Ala Glu Leu Glu Asp Lys Leu Tyr Asp Val Ser Thr Pro Ser Ser
-135 -130 -125

40 gcg aac tac ggc cag cac ctc tcc aag gag gag gtacgtatgc 268
Ala Asn Tyr Gly Gln His Leu Ser Lys Glu Glu
-120 -115

45 ctcccatgtc gctttgcgca gttcactcac gatcgtgtgc ag gtc gag caa ctc 322
Val Glu Gln Leu
-110

50 gtc gct ccc agt gcc gcg tct gtc gcc gct gtc aac gcc tgg ctc acc 370
Val Ala Pro Ser Ala Ala Ser Val Ala Ala Val Asn Ala Trp Leu Thr
-105 -100 -95

55 gag aac ggt ctc act gcg cag acc atc tcg ccg gcc ggc gat tgg ttg 418
Glu Asn Gly Leu Thr Ala Gln Thr Ile Ser Pro Ala Gly Asp Trp Leu
-90 -85 -80

gcg ttc gag gtg ccc gtc agc cag gcc aac gag ctc ttc gac gcc gac 466
Ala Phe Glu Val Pro Val Ser Gln Ala Asn Glu Leu Phe Asp Ala Asp
-75 -70 -65

60 ttc tcc gtg ttc acc cac gac gaa tcc ggt ctc cag gct gtc cgg act 514
Phe Ser Val Phe Thr His Asp Glu Ser Gly Leu Gln Ala Val Arg Thr
-60 -55 -50

65 ctc gcg tac tcc atc ccc gct gag ctg cag ggt cac ctg gac ctc gtc 562
Leu Ala Tyr Ser Ile Pro Ala Glu Leu Gln Gly His Leu Asp Leu Val
-45 -40 -35 -30

```

# ES 2 694 765 T3

	cac ccc acg atc ac gtcagtttcg ctgttcacagt ccgattatag cgggtcctga	616
	His Pro Thr Ile Thr -25	
5	ccacttgctc caatag g ttc ccg aac cct aac tcg cac ctt ccc gtc gtg	666
	Phe Pro Asn Pro Ser His Leu Pro Val Val -20 -15	
10	cgc tcg ccc gtg aag ccc att cag aac ctc acc tcg cgc gcc gtc ccg	714
	Arg Ser Pro Val Lys Pro Ile Gln Asn Leu Thr Ser Arg Ala Val Pro -10 -5 -1 1	
15	gct tcg tgc gct agc acc atc acc cct gcg tgc ctg cag gcg ctc tac	762
	Ala Ser Cys Ala Ser Thr Ile Thr Pro Ala Cys Leu Gln Ala Leu Tyr 5 10 15	
20	ggc atc ccc acc acc aag gcc acc cag tcc tcg aac aag ctc gct gtc	810
	Gly Ile Pro Thr Thr Lys Ala Thr Gln Ser Ser Asn Lys Leu Ala Val 20 25 30 35	
25	agc gcc ttc atc gac cag ttc gcc aac tcc gcc gac ttg aag	852
	Ser Gly Phe Ile Asp Gln Phe Ala Asn Ser Ala Asp Leu Lys 40 45	
30	gtgagtatctc tggcgccctg gaggccatct tcggtgctga cgatcatgatgaaccttcca	912
	g acc ttc ctc gcc aag ttc cgc acc gac atc tcg tcg tcg acg acc ttc	961
	Thr Phe Leu Gly Lys Phe Arg Thr Asp Ile Ser Ser Ser Thr Thr Phe 50 55 60 65	
35	acc ctc cag acc ctc gac ggt gga tcc aac agc cag tcc agc agc cag	1009
	Thr Leu Gln Thr Leu Asp Gly Gly Ser Asn Ser Gln Ser Ser Ser Gln 70 75 80	
40	gct ggt gtt gag gct gtaagtggcc ggcgatgctg ttacatggag actgggtgct	1064
	Ala Gly Val Glu Ala 85	
45	gacagcttga cgtag aac ttg gac gtc cag tac gct atc ggc atc gcc acg	1115
	Asn Leu Asp Val Gln Tyr Ala Ile Gly Ile Ala Thr 90 95	
50	ggc gtc cct acc acc ttc atc tcc gtc ggt gac gac ttc cag gac ggt	1163
	Gly Val Pro Thr Thr Phe Ile Ser Val Gly Asp Asp Phe Gln Asp Gly 100 105 110	
55	gac ctc gag gcc ttc ctc gac atc atc aac ttc ctc ctc aac gaa agc	1211
	Asp Leu Glu Gly Phe Leu Asp Ile Ile Asn Phe Leu Leu Asn Glu Ser 115 120 125 130	
60	gcg ccc ccg cag gtg ctc acg acc agc tac ggc cag aac gag aac acc	1259
	Ala Pro Pro Gln Val Leu Thr Thr Ser Tyr Gly Gln Asn Glu Asn Thr 135 140 145	
65	atc tcc gcc aag ctt gcc aa gtacgtgtga gcgcgctact gggaatactg	1309
	Ile Ser Ala Lys Leu Ala Asn 150	
70	tacactgacc ttctgtcttta cag c caa ctc tgc aac gca tac gct cag ctc	1360
	Gln Leu Cys Asn Ala Tyr Ala Gln Leu 155 160	
75	ggc gcg cgt gcc acc tcc atc ctc ttc gcg tcc ggc gac ggt ggt gtt	1408
	Gly Ala Arg Gly Thr Ser Ile Leu Phe Ala Ser Gly Asp Gly Gly Val 165 170 175	
80	gcc gcc tcg cag acc tcc agc tgc acc aag ttc ctg ccg acc ttc ccc	1456
	Ala Gly Ser Gln Thr Ser Ser Cys Thr Lys Phe Leu Pro Thr Phe Pro 180 185 190	



# ES 2 694 765 T3

	tcg ggc tgc ccc tt gtacgtcatt acgttcaacc ctctccgttc gaaacgctaa	1510
	Ser Gly Cys Pro Phe	
5	195	
	cacagtaccc gcttatcgca g c atg acc tcc gtc ggc gcg acg cag ggc atc	1562
	Met Thr Ser Val Gly Ala Thr Gln Gly Ile	
	200 205	
10	aac ccg gag acc gcc gcc gac ttc tcc tcc ggc ggc ttc tca aac gtc	1610
	Asn Pro Glu Thr Ala Ala Asp Phe Ser Ser Gly Gly Phe Ser Asn Val	
	210 215 220 225	
15	ttc gcc cgc ccc tcg tac cag tct acc gcc gtc agc agc tac ctg acc	1658
	Phe Ala Arg Pro Ser Tyr Gln Ser Thr Ala Val Ser Ser Tyr Leu Thr	
	230 235 240	
20	gcg ctc ggc agc acc aac tcg ggc aag ttc aac acc tcc ggc cgc gcg	1706
	Ala Leu Gly Ser Thr Asn Ser Gly Lys Phe Asn Thr Ser Gly Arg Ala	
	245 250 255	
25	ttc ccc gac atc gcc acc cag ggt gtc gac ttc gag atc gtc gtt ggc	1754
	Phe Pro Asp Ile Ala Thr Gln Gly Val Asp Phe Glu Ile Val Val Gly	
	260 265 270	
30	ggc cgc act gag ggc gtc gac ggc act agc tgc gcc agc ccg acg ctt	1802
	Gly Arg Thr Glu Gly Val Asp Gly Thr Ser Cys Ala Ser Pro Thr Leu	
	275 280 285	
35	gcc gcg atc atc tcg ctc ctg aac gac cgc ctc atc gcg gcc ggc aag	1850
	Ala Ala Ile Ile Ser Leu Leu Asn Asp Arg Leu Ile Ala Ala Gly Lys	
	290 295 300 305	
40	agc ccc ctt ggc ttc ctc aac ccc ttc ctg tac tcg gcg gcg ggc gcc	1898
	Ser Pro Leu Gly Phe Leu Asn Pro Phe Leu Tyr Ser Ala Ala Gly Ala	
	310 315 320	
45	gcg gca ctc acc gac atc acg tct ggc tcg aac ccc ggt tgc ggc acc	1946
	Ala Ala Leu Thr Asp Ile Thr Ser Gly Ser Asn Pro Gly Cys Gly Thr	
	325 330 335	
50	aac ggc ttc ccc gcg aag gct ggc tgg gac ccg gtacgtttct gtctccgtag	1999
	Asn Gly Phe Pro Ala Lys Ala Gly Trp Asp Pro	
	340 345	
55	cgcgcccgaa acataaactg acggctttgc ag gtc acc ggt ctt ggc acg ccc	2052
	Val Thr Gly Leu Gly Thr Pro	
	350 355	
60	aac ttc gcc aag ctg ctc act gct gtt ggc ctg taa	2088
	Asn Phe Ala Lys Leu Leu Thr Ala Val Gly Leu	
	360 365	
65	<210> 21	
	<211> 565	
	<212> PRT	
	<213> Trametes versicolor	
60	<400> 21	
	Met Val Ala Thr Ser Leu Leu Val Ala Ser Leu Phe Thr Leu Val	
	-195 -190 -185	
65	Leu Gly Thr Pro Thr Ala Arg Asn Leu Lys Leu His Glu Ser Arg	
	-180 -175 -170	

# ES 2 694 765 T3

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

# ES 2 694 765 T3

	100		105		110		115									
5	Leu	Glu	Gly	Phe	Leu	Asp	Ile	Ile	Asn	Phe	Leu	Leu	Asn	Glu	Ser	Ala
					120					125						130
10	Pro	Pro	Gln	Val	Leu	Thr	Thr	Ser	Tyr	Gly	Gln	Asn	Glu	Asn	Thr	Ile
				135					140					145		
15	Ser	Ala	Lys	Leu	Ala	Asn	Gln	Leu	Cys	Asn	Ala	Tyr	Ala	Gln	Leu	Gly
			150					155					160			
20	Ala	Arg	Gly	Thr	Ser	Ile	Leu	Phe	Ala	Ser	Gly	Asp	Gly	Gly	Val	Ala
		165					170					175				
25	Gly	Ser	Gln	Thr	Ser	Ser	Cys	Thr	Lys	Phe	Leu	Pro	Thr	Phe	Pro	Ser
	180					185					190					195
30	Gly	Cys	Pro	Phe	Met	Thr	Ser	Val	Gly	Ala	Thr	Gln	Gly	Ile	Asn	Pro
					200					205					210	
35	Glu	Thr	Ala	Ala	Asp	Phe	Ser	Ser	Gly	Gly	Phe	Ser	Asn	Val	Phe	Ala
				215					220					225		
40	Arg	Pro	Ser	Tyr	Gln	Ser	Thr	Ala	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Thr	Ala	Leu
			230					235					240			
45	Gly	Ser	Thr	Asn	Ser	Gly	Lys	Phe	Asn	Thr	Ser	Gly	Arg	Ala	Phe	Pro
		245					250					255				
50	Asp	Ile	Ala	Thr	Gln	Gly	Val	Asp	Phe	Glu	Ile	Val	Val	Gly	Gly	Arg
	260					265					270					275
55	Thr	Glu	Gly	Val	Asp	Gly	Thr	Ser	Cys	Ala	Ser	Pro	Thr	Leu	Ala	Ala
				280						285					290	
60	Ile	Ile	Ser	Leu	Leu	Asn	Asp	Arg	Leu	Ile	Ala	Ala	Gly	Lys	Ser	Pro
				295					300					305		
65	Leu	Gly	Phe	Leu	Asn	Pro	Phe	Leu	Tyr	Ser	Ala	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala
		310						315					320			
70	Leu	Thr	Asp	Ile	Thr	Ser	Gly	Ser	Asn	Pro	Gly	Cys	Gly	Thr	Asn	Gly
		325					330					335				
75	Phe	Pro	Ala	Lys	Ala	Gly	Trp	Asp	Pro	Val	Thr	Gly	Leu	Gly	Thr	Pro
	340					345					350					355
80	Asn	Phe	Ala	Lys	Leu	Leu	Thr	Ala	Val	Gly	Leu					
				360						365						

<210> 22  
<211> 1698

# ES 2 694 765 T3

```

<212>  ADN
<213>  Secuencia artificial

<220>
5  <223>  Constructo sintético

<220>
<221>  CDS
10 <222>  (1)..(1695)

<220>
<221>  sig_peptide
<222>  (1)..(51)
15

<220>
<221>  mat_peptide
<222>  (598)..(1695)

20 <400>  22

atg gtc gca aca tcg ttg ttg gtg gca tcg ttg ttc aca ttg gtc      45
Met Val Ala Thr Ser Leu Leu Val Ala Ser Leu Phe Thr Leu Val
                    -195                      -190                      -185

25 ttg gga aca ccg aca gca cgc aac ttg aaa ttg cat gaa tcc cga      90
Leu Gly Thr Pro Thr Ala Arg Asn Leu Lys Leu His Glu Ser Arg
                    -180                      -175                      -170

30 gag gaa att cct gca gga ttc tcg ttg tcg gga gca gca tcg cct      135
Glu Glu Ile Pro Ala Gly Phe Ser Leu Ser Gly Ala Ala Ser Pro
                    -165                      -160                      -155

35 gat aca aca ttg aaa ttg cgg ttg gca ttg gtc cag tcg aac ttc      180
Asp Thr Thr Leu Lys Leu Arg Leu Ala Leu Val Gln Ser Asn Phe
                    -150                      -145                      -140

40 gca gag ttg gag gac aaa ttg tat gat gtc tcg aca cct tcg tcg      225
Ala Glu Leu Glu Asp Lys Leu Tyr Asp Val Ser Thr Pro Ser Ser
                    -135                      -130                      -125

45 gca aac tat gga cag cac ttg tcc aaa gag gag gtc gag cag ttg      270
Ala Asn Tyr Gly Gln His Leu Ser Lys Glu Glu Val Glu Gln Leu
                    -120                      -115                      -110

50 gtc gca ccc tcg gca gca tcg gtg gca gca gtc aac gca tgg ttg aca      318
Val Ala Pro Ser Ala Ala Ser Val Ala Ala Val Asn Ala Trp Leu Thr
                    -105                      -100                      -95

55 gaa aac gga ttg aca gca cag aca att tcg cct gca gga gat tgg ttg      366
Glu Asn Gly Leu Thr Ala Gln Thr Ile Ser Pro Ala Gly Asp Trp Leu
                    -90                      -85                      -80

60 gca ttc gag gtg cct gtc tcg cag gca aac gag ttg ttc gat gca gat      414
Ala Phe Glu Val Pro Val Ser Gln Ala Asn Glu Leu Phe Asp Ala Asp
                    -75                      -70                      -65

65 ttc tcg gtg ttc aca cat gat gag tcg gga ttg cag gca gtc cga aca      462
Phe Ser Val Phe Thr His Asp Glu Ser Gly Leu Gln Ala Val Arg Thr
                    -60                      -55                      -50

70 ttg gca tat tcg att ccc gca gaa ttg cag gga cac ttg gat ttg gtg      510
Leu Ala Tyr Ser Ile Pro Ala Glu Leu Gln Gly His Leu Asp Leu Val
                    -45                      -40                      -35

75 cat ccc aca att aca ttc ccc aac ccc aac tcg cat ttg ccc gtc gtg      558
His Pro Thr Ile Thr Phe Pro Asn Pro Asn Ser His Leu Pro Val Val
                    -25                      -20                      -15

```

# ES 2 694 765 T3

	cg	tc	cc	gt	aa	cc	at	ca	aa	tt	ac	tc	cg	gc	gt	cc	606
	Arg	Ser	Pro	Val	Lys	Pro	Ile	Gln	Asn	Leu	Thr	Ser	Arg	Ala	Val	Pro	
				-10					-5				-1	1			
5	gc	tc	tg	gc	tc	ac	at	ac	cc	gc	tg	tt	cg	gc	tt	ta	654
	Ala	Ser	Cys	Ala	Ser	Thr	Ile	Thr	Pro	Ala	Cys	Leu	Gln	Ala	Leu	Tyr	
	5						10					15					
10	gg	at	cc	ac	ac	aa	gc	ac	ca	tc	tc	aa	aa	tt	gc	gt	702
	Gly	Ile	Pro	Thr	Thr	Lys	Ala	Thr	Gln	Ser	Ser	Asn	Lys	Leu	Ala	Val	
	20					25					30					35	
15	tc	gg	tt	at	ga	ca	tt	gc	aa	tc	gc	ga	tt	aa	ac	tt	750
	Ser	Gly	Phe	Ile	Asp	Gln	Phe	Ala	Asn	Ser	Ala	Asp	Leu	Lys	Thr	Phe	
					40					45					50		
20	tt	gg	aa	tt	cg	ac	ga	at	tc	tc	tc	ac	ac	tt	ac	tt	798
	Leu	Gly	Lys	Phe	Arg	Thr	Asp	Ile	Ser	Ser	Ser	Thr	Thr	Phe	Thr	Leu	
				55					60					65			
25	ca	ac	tt	ga	gg	tc	aa	tc	ca	tc	tc	tc	tc	ca	gc	gg	846
	Gln	Thr	Leu	Asp	Gly	Gly	Ser	Asn	Ser	Gln	Ser	Ser	Ser	Gln	Ala	Gly	
			70					75					80				
30	gt	ga	gc	aa	tt	ga	gt	ca	ta	gc	at	gg	at	gc	ac	gg	894
	Val	Glu	Ala	Asn	Leu	Asp	Val	Gln	Tyr	Ala	Ile	Gly	Ile	Ala	Thr	Gly	
		85					90					95					
35	gt	cc	ac	ac	tt	at	tc	gt	gg	ga	ga	tt	ca	ga	gg	ga	942
	Val	Pro	Thr	Thr	Phe	Ile	Ser	Val	Gly	Asp	Asp	Phe	Gln	Asp	Gly	Asp	
	100					105					110					115	
40	tt	ga	gg	tt	tt	ga	at	at	aa	tt	tt	tt	aa	ga	tc	gc	990
	Leu	Glu	Gly	Phe	Leu	Asp	Ile	Ile	Asn	Phe	Leu	Leu	Asn	Glu	Ser	Ala	
					120					125					130		
45	cc	cc	ca	gt	tt	ac	ac	tc	ta	gg	ca	aa	ga	aa	ac	at	1038
	Pro	Pro	Gln	Val	Leu	Thr	Thr	Ser	Tyr	Gly	Gln	Asn	Glu	Asn	Thr	Ile	
				135					140					145			
50	tc	gc	aa	tt	gc	aa	ca	tt	tg	tg	aa	gc	ta	gc	ca	tt	1086
	Ser	Ala	Lys	Leu	Ala	Asn	Gln	Leu	Cys	Asn	Ala	Tyr	Ala	Gln	Leu	Gly	
			150					155					160				
55	gc	cg	gg	ac	tc	at	tt	gc	tc	gg	ga	tt	cg	gg	gg	gt	1134
	Ala	Arg	Gly	Thr	Ser	Ile	Leu	Phe	Ala	Ser	Gly	Asp	Gly	Gly	Val	Ala	
		165					170					175					
60	gg	tc	ca	ac	tc	tc	tg	ac	aa	tt	tt	cc	ac	tt	cc	tc	1182
	Gly	Ser	Gln	Thr	Ser	Ser	Cys	Thr	Lys	Phe	Leu	Pro	Thr	Phe	Pro	Ser	
	180					185					190					195	
65	gg	tg	cc	tt	at	ac	tc	gt	gg	gc	ac	ca	gg	at	aa	cc	1230
	Gly	Cys	Pro	Phe	Met	Thr	Ser	Val	Gly	Ala	Thr	Gln	Gly	Ile	Asn	Pro	
					200					205					210		
70	ga	ac	gc	gc	ga	tt	tc	tc	gg	gg	tt	tc	aa	gt	tt	gc	1278
	Glu	Thr	Ala	Ala	Asp	Phe	Ser	Ser	Gly	Gly	Phe	Ser	Asn	Val	Phe	Ala	
				215					220					225			
75	ag	cc	tc	ta	ca	tc	ac	gc	gt	tc	tc	ta	tt	ac	gc	tt	1326
	Arg	Pro	Ser	Tyr	Gln	Ser	Thr	Ala	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Thr	Ala	Leu	
				230				235					240				
80	gg	tc	ac	aa	tc	gg	aa	tt	aa	ac	tc	gg	cg	gc	tt	cc	1374
	Gly	Ser	Thr	Asn	Ser	Gly	Lys	Phe	Asn	Thr	Ser	Gly	Arg	Ala	Phe	Pro	
		245					250					255					
85	ga	at	gc	ac	ca	gg	gt	ga	tt	ga	at	gt	gt	gg	gg	ag	1422

# ES 2 694 765 T3

	Asp Ile Ala Thr Gln Gly Val Asp Phe Glu Ile Val Val Gly Gly Arg	
	260 265 270 275	
5	aca gaa gga gtg gat gga aca tcc tgt gca tcc ccg aca ttg gca gcc Thr Glu Gly Val Asp Gly Thr Ser Cys Ala Ser Pro Thr Leu Ala Ala	1470
	280 285 290	
10	atc att tcc ttg ttg aac gat cga ttg att gca gca gga aaa tcc ccc Ile Ile Ser Leu Leu Asn Asp Arg Leu Ile Ala Ala Gly Lys Ser Pro	1518
	295 300 305	
15	ttg gga ttc ttg aac cct ttc ttg tat tcc gcc gca ggc gcc gcc gca Leu Gly Phe Leu Asn Pro Phe Leu Tyr Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala	1566
	310 315 320	
20	ttg aca gac att aca tcg ggc tcc aac cct gga tgt gga aca aac gga Leu Thr Asp Ile Thr Ser Gly Ser Asn Pro Gly Cys Gly Thr Asn Gly	1614
	325 330 335	
25	aac ttc gcc aaa ttg ttg aca gca gtg gga ttg taa Asn Phe Ala Lys Leu Leu Thr Ala Val Gly Leu	1662
	340 345 350 355	
30	<210> 23 <211> 565 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Constructo sintético  <400> 23	
40	Met Val Ala Thr Ser Leu Leu Val Ala Ser Leu Phe Thr Leu Val -195 -190 -185	
45	Leu Gly Thr Pro Thr Ala Arg Asn Leu Lys Leu His Glu Ser Arg -180 -175 -170	
50	Glu Glu Ile Pro Ala Gly Phe Ser Leu Ser Gly Ala Ala Ser Pro -165 -160 -155	
55	Asp Thr Thr Leu Lys Leu Arg Leu Ala Leu Val Gln Ser Asn Phe -150 -145 -140	
60	Ala Glu Leu Glu Asp Lys Leu Tyr Asp Val Ser Thr Pro Ser Ser -135 -130 -125	
65	Ala Asn Tyr Gly Gln His Leu Ser Lys Glu Glu Val Glu Gln Leu -120 -115 -110	
	Val Ala Pro Ser Ala Ala Ser Val Ala Ala Val Asn Ala Trp Leu Thr -105 -100 -95	
	Glu Asn Gly Leu Thr Ala Gln Thr Ile Ser Pro Ala Gly Asp Trp Leu -90 -85 -80	

# ES 2 694 765 T3

Ala Phe Glu Val Pro Val Ser Gln Ala Asn Glu Leu Phe Asp Ala Asp  
 -75 -70 -65  
 5  
 Phe Ser Val Phe Thr His Asp Glu Ser Gly Leu Gln Ala Val Arg Thr  
 -60 -55 -50  
 10  
 Leu Ala Tyr Ser Ile Pro Ala Glu Leu Gln Gly His Leu Asp Leu Val  
 -45 -40 -35 -30  
 15  
 His Pro Thr Ile Thr Phe Pro Asn Pro Asn Ser His Leu Pro Val Val  
 -25 -20 -15  
 20  
 Arg Ser Pro Val Lys Pro Ile Gln Asn Leu Thr Ser Arg Ala Val Pro  
 -10 -5 -1 1  
 25  
 Ala Ser Cys Ala Ser Thr Ile Thr Pro Ala Cys Leu Gln Ala Leu Tyr  
 5 10 15  
 30  
 Gly Ile Pro Thr Thr Lys Ala Thr Gln Ser Ser Asn Lys Leu Ala Val  
 20 25 30 35  
 35  
 Ser Gly Phe Ile Asp Gln Phe Ala Asn Ser Ala Asp Leu Lys Thr Phe  
 40 45 50  
 40  
 Leu Gly Lys Phe Arg Thr Asp Ile Ser Ser Ser Thr Thr Phe Thr Leu  
 55 60 65  
 45  
 Gln Thr Leu Asp Gly Gly Ser Asn Ser Gln Ser Ser Ser Gln Ala Gly  
 70 75 80  
 50  
 Val Glu Ala Asn Leu Asp Val Gln Tyr Ala Ile Gly Ile Ala Thr Gly  
 85 90 95  
 55  
 Val Pro Thr Thr Phe Ile Ser Val Gly Asp Asp Phe Gln Asp Gly Asp  
 100 105 110 115  
 60  
 Leu Glu Gly Phe Leu Asp Ile Ile Asn Phe Leu Leu Asn Glu Ser Ala  
 120 125 130  
 65  
 Pro Pro Gln Val Leu Thr Thr Ser Tyr Gly Gln Asn Glu Asn Thr Ile  
 135 140 145  
 70  
 Ser Ala Lys Leu Ala Asn Gln Leu Cys Asn Ala Tyr Ala Gln Leu Gly  
 150 155 160  
 75  
 Ala Arg Gly Thr Ser Ile Leu Phe Ala Ser Gly Asp Gly Gly Val Ala  
 165 170 175  
 80  
 Gly Ser Gln Thr Ser Ser Cys Thr Lys Phe Leu Pro Thr Phe Pro Ser  
 180 185 190 195

# ES 2 694 765 T3

Gly Cys Pro Phe Met Thr Ser Val Gly Ala Thr Gln Gly Ile Asn Pro  
200 205 210

5 Glu Thr Ala Ala Asp Phe Ser Ser Gly Gly Phe Ser Asn Val Phe Ala  
215 220 225

10 Arg Pro Ser Tyr Gln Ser Thr Ala Val Ser Ser Tyr Leu Thr Ala Leu  
230 235 240

15 Gly Ser Thr Asn Ser Gly Lys Phe Asn Thr Ser Gly Arg Ala Phe Pro  
245 250 255

20 Asp Ile Ala Thr Gln Gly Val Asp Phe Glu Ile Val Val Gly Gly Arg  
260 265 270 275

Thr Glu Gly Val Asp Gly Thr Ser Cys Ala Ser Pro Thr Leu Ala Ala  
280 285 290

25 Ile Ile Ser Leu Leu Asn Asp Arg Leu Ile Ala Ala Gly Lys Ser Pro  
295 300 305

30 Leu Gly Phe Leu Asn Pro Phe Leu Tyr Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ala  
310 315 320

35 Leu Thr Asp Ile Thr Ser Gly Ser Asn Pro Gly Cys Gly Thr Asn Gly  
325 330 335

Phe Pro Ala Lys Ala Gly Trp Asp Pro Val Thr Gly Leu Gly Thr Pro  
340 345 350 355

40 Asn Phe Ala Lys Leu Leu Thr Ala Val Gly Leu  
360 365

45 <210> 24  
<211> 366  
<212> PRT  
<213> Trametes versicolor

50 <220>  
<221> mat\_polypepitde  
<222> (1)..(366)

55 <400> 24

Ala Val Pro Ala Ser Cys Ala Ser Thr Ile Thr Pro Ala Cys Leu Gln  
1 5 10 15

60 Ala Leu Tyr Gly Ile Pro Thr Thr Lys Ala Thr Gln Ser Ser Asn Lys  
20 25 30

65 Leu Ala Val Ser Gly Phe Ile Asp Gln Phe Ala Asn Ser Ala Asp Leu  
35 40 45

Lys Thr Phe Leu Gly Lys Phe Arg Thr Asp Ile Ser Ser Ser Thr Thr



# ES 2 694 765 T3

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

# ES 2 694 765 T3

Thr Asn Gly Phe Pro Ala Lys Ala Gly Trp Asp Pro Val Thr Gly Leu  
 340 345 350  
 5  
 Gly Thr Pro Asn Phe Ala Lys Leu Leu Thr Ala Val Gly Leu  
 355 360 365  
 10  
 <210> 25  
 <211> 567  
 <212> PRT  
 <213> Dichomitus squalens  
 15  
 <400> 25  
 Met Val Ala Ser Gly Leu Phe Leu Ala Ser Leu Ile Ala Leu Ala Leu  
 1 5 10 15  
 20  
 Gly Lys Pro Thr Ala Arg Asn Leu Lys Leu His Glu Ser Arg Pro Ser  
 20 25 30  
 25  
 Ala Pro Asn Gly Phe Ser Leu Val Gly Ser Ala Asp Ser Asn Arg Thr  
 35 40 45  
 30  
 Leu Lys Leu Arg Leu Ala Leu Ala Glu Ser Asn Phe Ser Glu Leu Glu  
 50 55 60  
 35  
 Arg Lys Leu Tyr Asp Val Ser Thr Pro Lys Ser Ala Asn Tyr Gly Lys  
 65 70 75 80  
 40  
 His Leu Ser Lys Ala Glu Val Gln Gln Leu Val Ala Pro Gly Gln Asp  
 85 90 95  
 45  
 Ser Ile Asp Ala Val Asn Ser Trp Leu Lys Glu Asn Asp Ile Thr Ala  
 100 105 110  
 50  
 Lys Thr Ile Ser Ser Thr Gly Glu Trp Ile Ser Phe Glu Val Pro Val  
 115 120 125  
 55  
 Ser Lys Ala Asn Asp Leu Phe Asp Ala Asp Phe Ser Val Phe Lys His  
 130 135 140  
 60  
 Asp Asp Thr Gly Val Glu Ala Ile Arg Thr Leu Ser Tyr Ser Ile Pro  
 145 150 155 160  
 65  
 Ala Glu Leu Gln Gly His Leu Asp Leu Val His Pro Thr Val Thr Phe  
 165 170 175  
 Pro Asn Pro Tyr Ser His Leu Pro Val Phe Gln Ser Pro Val Lys Lys  
 180 185 190  
 Thr Ala Glu Ile Gln Asn Phe Thr Ala Gly Ala Ile Pro Ser Ser Cys  
 195 200 205

# ES 2 694 765 T3

	Ser	Ser	Thr	Ile	Thr	Pro	Ala	Cys	Leu	Gln	Ala	Ile	Tyr	Asn	Ile	Pro	
	210						215					220					
5	Thr	Thr	Ala	Ala	Thr	Glu	Ser	Ser	Asn	Gln	Leu	Gly	Val	Thr	Gly	Phe	
	225					230					235					240	
10	Ile	Asp	Gln	Tyr	Ala	Asn	Lys	Lys	Asp	Leu	Lys	Thr	Phe	Leu	Lys	Lys	
					245					250					255		
15	Tyr	Arg	Thr	Asp	Ile	Ser	Ser	Ser	Thr	Thr	Phe	Thr	Leu	Gln	Thr	Leu	
				260					265					270			
20	Asp	Gly	Gly	Ser	Asn	Ser	Gln	Thr	Gly	Ser	Lys	Ala	Gly	Val	Glu	Ala	
			275					280					285				
25	Asn	Leu	Asp	Ile	Gln	Tyr	Thr	Val	Gly	Val	Ala	Thr	Gly	Val	Pro	Thr	
	290						295					300					
30	Thr	Phe	Ile	Ser	Val	Gly	Asp	Asp	Phe	Gln	Asp	Gly	Asp	Leu	Glu	Gly	
	305					310					315					320	
35	Phe	Leu	Asp	Val	Ile	Asn	Ala	Leu	Leu	Asp	Glu	Asp	Ala	Pro	Pro	Ser	
					325					330					335		
40	Val	Leu	Thr	Thr	Ser	Tyr	Gly	Gln	Asp	Glu	Ser	Thr	Ile	Ser	Arg	Ala	
				340					345					350			
45	Leu	Ala	Val	Lys	Leu	Cys	Asn	Ala	Tyr	Ala	Gln	Leu	Gly	Ala	Arg	Gly	
			355					360					365				
50	Val	Ser	Ile	Leu	Phe	Ala	Ser	Gly	Asp	Gly	Gly	Val	Ser	Gly	Ser	Gln	
	370						375					380					
55	Ser	Ala	Ser	Cys	Ser	Lys	Phe	Val	Pro	Thr	Phe	Pro	Ser	Gly	Cys	Pro	
	385					390					395					400	
60	Tyr	Met	Thr	Ser	Val	Gly	Ala	Thr	Gln	Gly	Val	Asn	Pro	Glu	Thr	Ala	
					405					410					415		
65	Ala	Asp	Phe	Ser	Ser	Gly	Gly	Phe	Ser	Asn	Tyr	Trp	Gly	Val	Pro	Asp	
				420					425					430			
70	Tyr	Gln	Ser	Asp	Ala	Val	Ser	Thr	Tyr	Leu	Ser	Ala	Leu	Gly	Lys	Thr	
			435					440					445				
75	Asn	Ser	Gly	Lys	Tyr	Asn	Ala	Ser	Gly	Arg	Gly	Phe	Pro	Asp	Val	Ser	
	450						455					460					
80	Thr	Gln	Gly	Val	Ser	Phe	Glu	Val	Val	Val	Asp	Gly	Ser	Val	Glu	Ala	
	465					470					475					480	
85	Val	Asp	Gly	Thr	Ser	Cys	Ala	Ser	Pro	Thr	Phe	Ala	Ser	Ile	Ile	Ser	

# ES 2 694 765 T3

	485		490		495
5	Leu Val Asn Asp Lys Leu Val Ala Ala Gly Lys Ser Pro Leu Gly Phe	500	505	510	
10	Leu Asn Pro Phe Leu Tyr Ser Asp Gly Val Ala Ala Leu Asn Asp Ile	515	520	525	
15	Thr Ser Gly Ser Asn Pro Gly Cys Asn Thr Asn Gly Phe Pro Ala Lys	530	535	540	
	Lys Gly Trp Asp Pro Val Thr Gly Leu Gly Thr Pro Asp Phe Lys Lys	545	550	555	560
20	Leu Leu Thr Ala Val Gly Leu	565			

## REIVINDICACIONES

1. Polipéptido aislado dotado de actividad de proteasa, seleccionado del grupo constituido por:

- 5 (a) un polipéptido que presenta al menos un 84% de identidad de secuencia con el polipéptido de SEQ ID N.º: 5;  
 (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que presenta al menos un 84% de identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 1;  
 (c) una variante del polipéptido de SEQ ID N.º: 5 comprendiendo una sustitución, delección, y/o inserción en una o más posiciones, en la que el número total de sustituciones, delecciones y/o inserciones de aminoácidos no es superior a 20; y  
 10 (d) un fragmento de un polipéptido de (a), (b) o (c) dotado de actividad de proteasa,

en el que el polipéptido tiene una actividad de proteasa mejorada entre pH 3 y 4, a 25°C en comparación con la proteasa con la secuencia mostrada en SEQ ID N.º: 8 de la cepa NRRL 18262.

2. Polipéptido según la reivindicación 1 que comprende o consiste en SEQ ID N.º: 2, SEQ ID N.º: 4, SEQ ID N.º: 5 o SEQ ID N.º: 6.

15 3. Composición que comprende el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.

4. Composición según la reivindicación 3 que está en forma de un granulado o un microgranulado.

5. Polinucleótido aislado que codifica el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.

20 6. Constructo de ácido nucleico o vector de expresión que comprende el polinucleótido según la reivindicación 5 unido operativamente a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en una célula huésped de expresión.

7. Célula huésped de expresión recombinante comprendiendo el polinucleótido según la reivindicación 5 unido operativamente a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido, donde el huésped es seleccionado del grupo constituido por *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*,  
 25 *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trametes*, y *Trichoderma* o en la que el huésped es una levadura, tal como *Pichia* o *Saccharomyces*, o un *Bacillus* tal como *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*,  
 30 *Bacillus firmus*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* o *Bacillus thuringiensis*.

8. Célula huésped según la reivindicación 7, donde el huésped es un *Aspergillus*, tal como *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*.

9. Método para producir el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que comprende:

- 35 (a) el cultivo de una célula, que en su forma tipo salvaje produce el polipéptido, bajo condiciones que conducen a la producción del polipéptido; y  
 (b) la recuperación del polipéptido.

10. Método para producir el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que comprende:

- 40 (a) el cultivo de una célula huésped según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8 bajo condiciones que conducen a la producción del polipéptido; y  
 (b) la recuperación del polipéptido.

11. Composición de pienso para animales que comprende el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.

12. Composición de pienso para animales según la reivindicación 11, que comprende además una o más amilasas, fitasas, xilanasas, galactanasas, alfa-galactosidasas, proteasas, fosfolipasas, beta-glucanasas, o cualquier mezcla de las mismas.
- 5 13. Composición de pienso para animales según la reivindicación 12, que comprende además al menos un probiótico o producto microbiano para alimentación directa (DFM).
14. Uso de al menos un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2  
  
en piensos para animales;  
en aditivos de piensos para animales;  
10 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;  
para aumentar el grado de hidrólisis de proteínas en dietas animales; y/o  
para el tratamiento de proteínas.
- 15 15. Método para mejorar el valor nutricional de un pienso para animales, en el que al menos un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 se añade al pienso.
16. Aditivo para piensos para animales que comprende  
  
al menos un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2; y  
al menos una vitamina liposoluble, y/o  
20 al menos una vitamina hidrosoluble, y/o  
al menos un oligoelemento.
17. Aditivo para piensos para animales según la reivindicación 16, que comprende además una o más amilasas; fitasas; xilanasas; galactanasas; alfa-galactosidasas; proteasas, fosfolipasas, beta-glucanasas, o cualquier mezcla de las mismas.
- 25 18. Pienso para animales que tiene un contenido de proteína bruta de 50 a 800 g/kg y que comprende al menos un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.
19. Método para el tratamiento de proteínas, que comprende el paso de la adición de al menos un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 a al menos una proteína o fuente de proteínas.
20. Método según la reivindicación 19, en el que se incluye soja o harina de soja entre la al menos una fuente de proteínas.

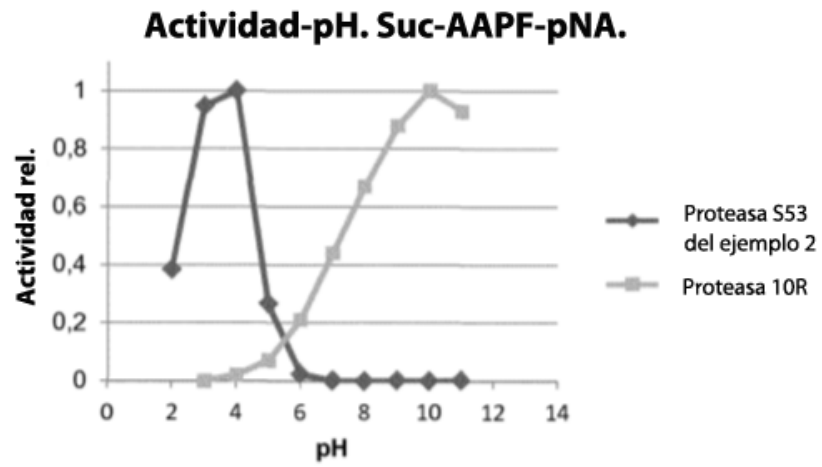


Figura 1

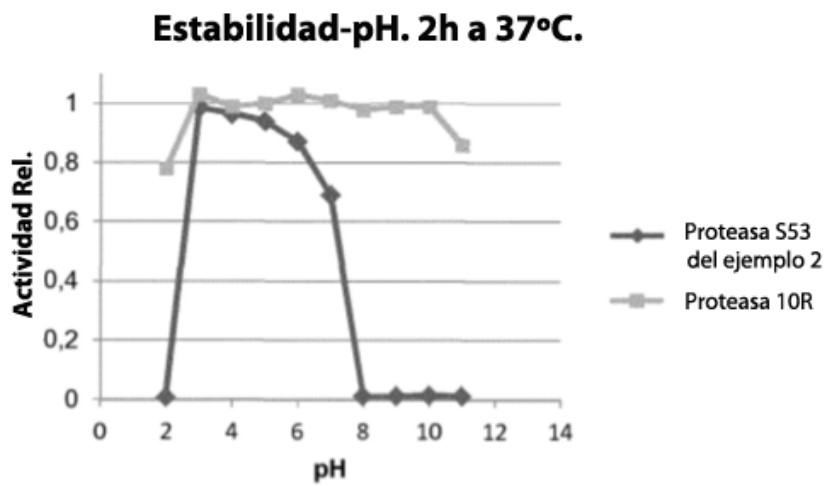


Figura 2

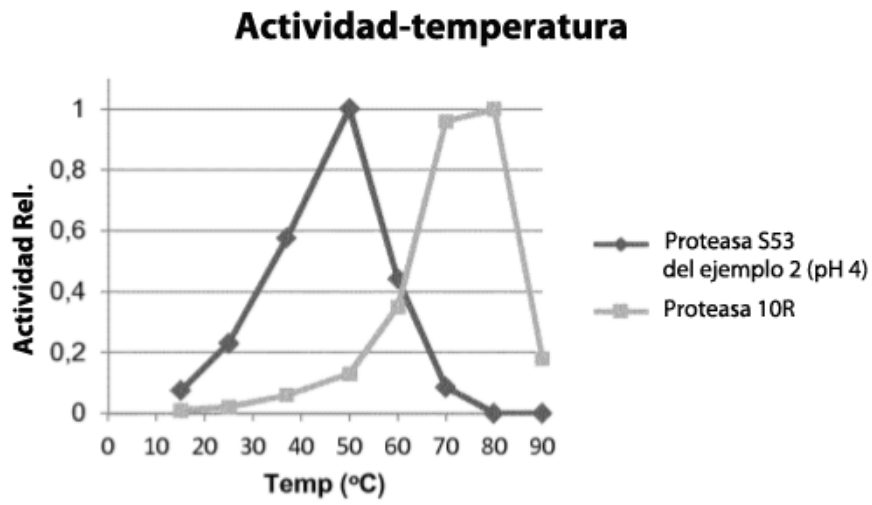


Figura 3

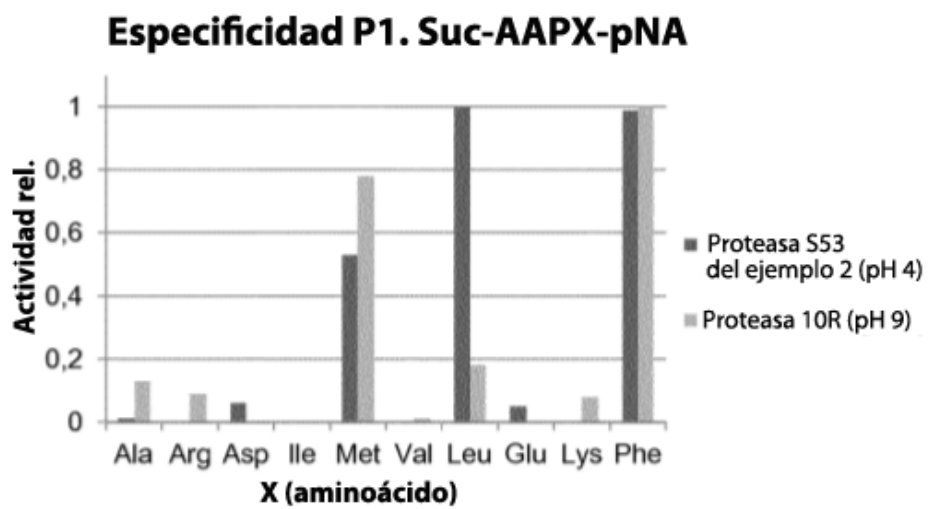


Figura 4



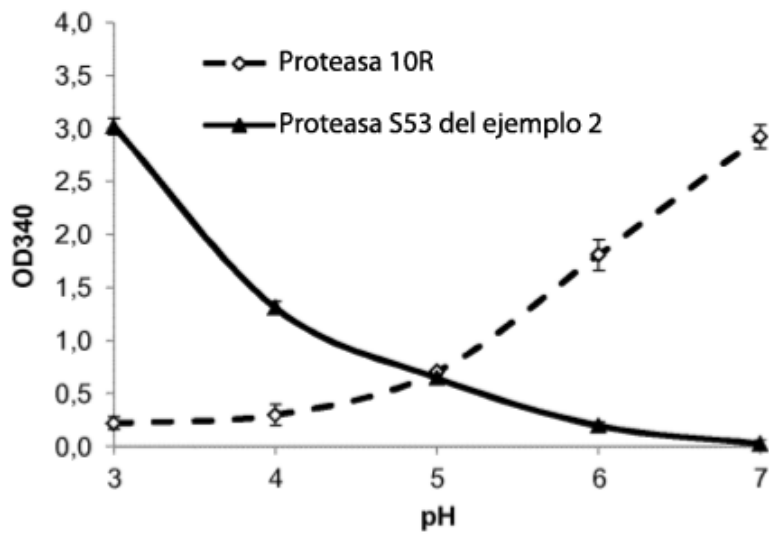


Figura 5

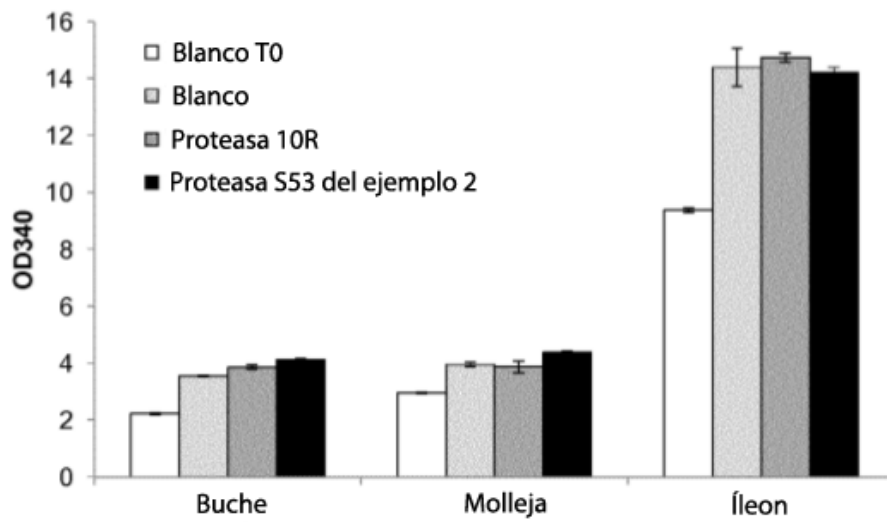


Figura 6

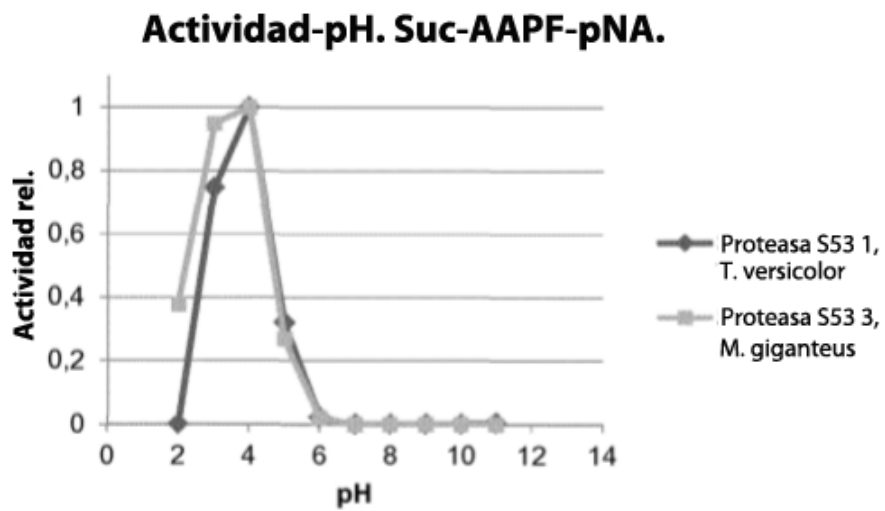


Figura 7

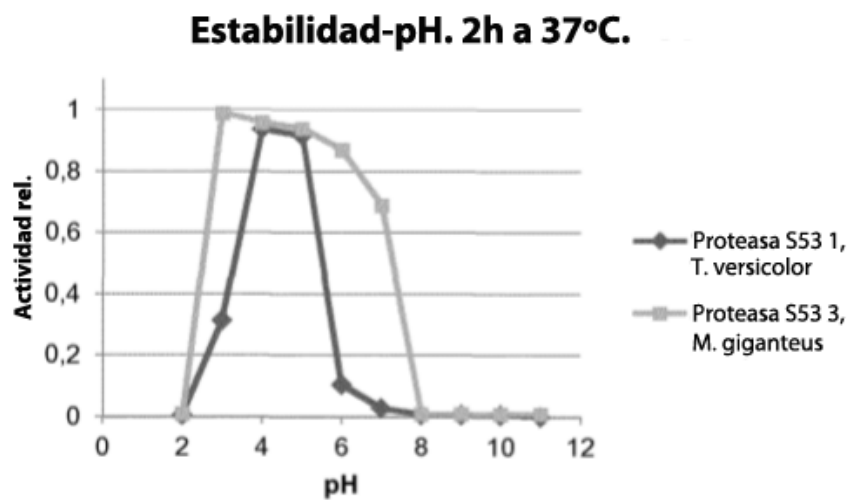


Figura 8

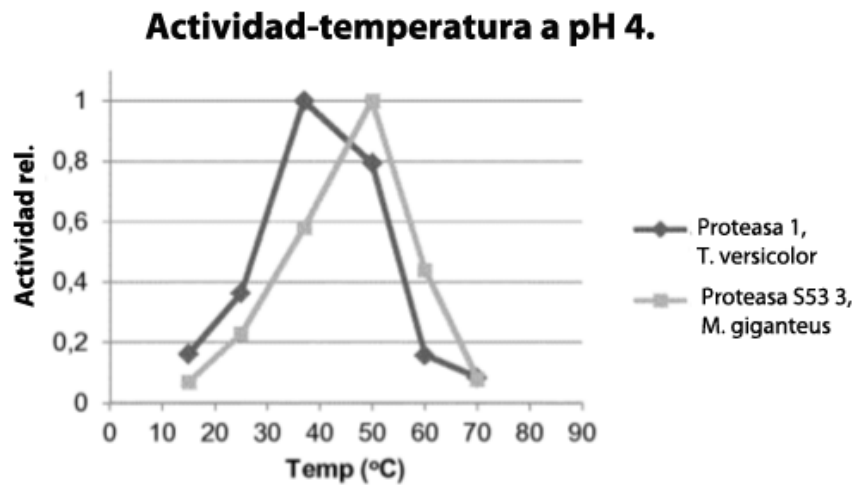


Figura 9

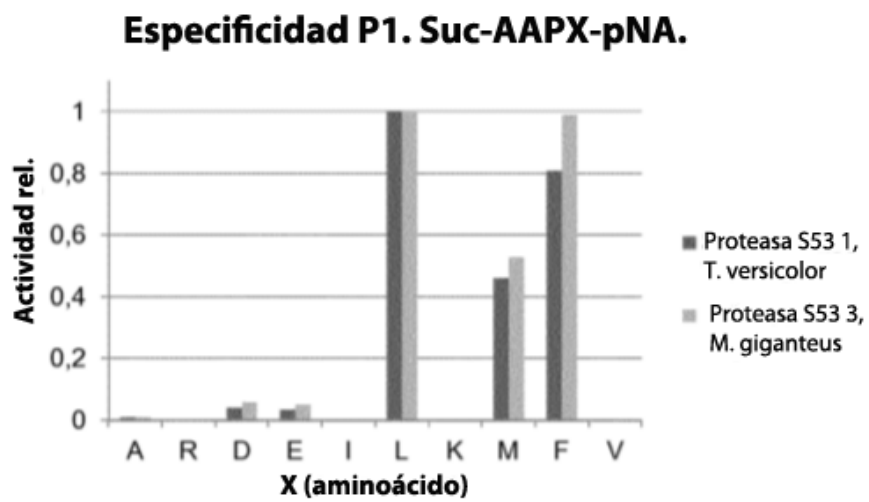


Figura 10