

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2005.10.17**

(30) Prioridade(s): **2004.10.18 GB 0423139**

(43) Data de publicação do pedido: **2010.10.06**

(45) Data e BPI da concessão: **2012.09.19**
245/2012

(73) Titular(es):

DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS
LANGEBROGADE 1 POSTBOKS 17 1001
COPENHAGEN K.

DK

(72) Inventor(es):

OLIVER KENSCH
KLAUS PELLENGAHR
BIRGITTA LEUTHNER
ANDREI MIASNIKOV
VIJAY KUMAR

DE
DE
DE
US
IT

(74) Mandatário:

ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO
RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **FITASES**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A ENZIMAS E PROCESSOS. EM PARTICULAR, É DESCRITA UMA CÉLULA HOSPEDEIRA TRANSFORMADA OU TRANSFECTADA COM UM ÁCIDO NUCLEICO QUE CODIFICA UMA ENZIMA FITASE BACTERIANA E SUAS VARIANTES.

RESUMO

"FITASES"

A presente invenção refere-se a enzimas e processos. Em particular, é descrita uma célula hospedeira transformada ou transfectada com um ácido nucleico que codifica uma enzima fitase bacteriana e suas variantes.

DESCRIÇÃO

"FITASES"

A presente invenção refere-se a fitases, sequências nucleotídicas para as mesmas, métodos de produção de fitases e sua utilização.

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se ao campo de enzimas para aditivos de rações. De um modo mais específico, a presente invenção refere-se a fitases que podem ser utilizadas para melhorar a digestão de fosfato em alimentos e rações animais.

ANTECEDENTES TÉCNICOS E TÉCNICA ANTERIOR

O fitato é a maior forma de armazenamento de fósforo em cereais e legumes. No entanto, os animais monogástricos, tal como o porco, aves domésticas e peixe, não estão aptos para metabolizar ou absorver fitato (ou ácido fítico) e, portanto, é excretado levando à poluição por fósforo em áreas de intensa produção de gado. Além disso, o ácido fítico também actua como um agente anti-nutricional em animais monogástricos por quelação de agentes metálicos, tais como cálcio, cobre e zinco.

De modo a proporcionar fosfatos suficientes para o

crescimento e saúde destes animais, é adicionado fosfato inorgânico às suas dietas. Essa adição pode ser dispendiosa e aumenta ainda os problemas de poluição.

Através da acção de fitase, o fitato é, geralmente, hidrolisado para obter fosfatos de inositol inferiores e fosfato inorgânico. As fitases são úteis como aditivos para rações animais onde melhoram a disponibilidade de fósforo orgânico ao animal e diminuem a poluição de fosfato do ambiente (Wodzinski RJ, Ullah AH. *Adv Appl Microbiol.* 42, 263-302 (1996)).

Foram descritas na literatura uma variedade de fitases de origem fúngica (Wyss M. et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (2), 367-373 (1999); Berka R.M. et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (11), 4423-4427 (1998); Lassen S. et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (10), 4701-4707 (2001)) e bacteriana (Greiner R. et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 303 (1), 107-113 (1993); Kerovuo et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (6), 2079-2085 (1998); Kim H.W. et al., *Biotechnol. Lett.* 25, 1231-1234 (2003); Greiner R. et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 341 (2), 201-206 (1997); Yoon S.J. et al., *Enzyme and microbial technol.* 18, 449-454 (1996); Zinin N.V. et al., *FEMS Microbiol. Lett.* 236, 283-290 (2004)).

Por exemplo, as enzimas fitase *E. coli* mutantes e suas variantes naturais são conhecidas do documento WO 2004/015084 e as fitases produzidas de *Citrobacter braakii* são conhecidas do documento WO 2004/085638. As fitases bacterianas adicionais foram proporcionadas utilizando métodos de amostragem e rastreamento (Zinn N. V. et al., *Biotehnologia*, Glavnoe Upravlenie Mikrobiologiceskoj Promy Lennosti Pri, 2, 3-10 (2003)).

No entanto, até à data, nenhuma destas fitases apresenta as propriedades necessárias para utilização eficaz como suplemento de rações animais. Em particular, as fitases fúngicas tendem a ser proteoliticamente instáveis (Igbasan F.A. et al., *Arch. Anim. Nutr.* 53,353-373 (2000)) e, portanto, susceptíveis a degradação, enquanto muitas fitases bacterianas possuem uma especificidade de substrato limitada para fitato isolado e degradam deficientemente fosfatos de inositol de graus intermédios de fosforilação (Greiner R. et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 303 (1), 107-113 (1993); Kerovuo J et al., *Biochem. J.* 352, 623-628 (2000)). Verifica-se que é altamente desejável uma fitase termoestável e estável a ácidos com vasta especificidade de substrato e elevada actividade específica, de um modo particular, para efeitos de nutrição animal (Vats P et al., *Enzyme and Microbial Technology.* 35, 3-14 (2004)).

Assim, existe uma necessidade para fitases melhoradas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Num aspecto lato, a presente invenção refere-se a moléculas de ácido nucleico isoladas que codificam para fitases derivadas de uma bactéria e suas formas modificadas. Em particular, a invenção refere-se a moléculas de ácido nucleico isoladas que codificam para fitases derivadas da bactéria *Buttiauxella sp.* e suas variantes/formas modificadas seleccionadas e/ou construídas para características melhoradas comparadas à enzima de tipo selvagem (progenitora).

A presente invenção é vantajosa uma vez que proporciona uma molécula de ácido nucleico isolada que codifica para novas

fitases que possuem propriedades tornando-as particularmente úteis e eficazes como enzimas alimentares. Em particular, a invenção refere-se a uma molécula de ácido nucleico isolada que codifica para polipéptidos de fitases novos isolados e/ou purificados como aqui descritos ou um seu fragmento funcional ou variantes ou suas formas modificadas, ou sua forma modificada.

Para ser eficaz como aditivo enzimático para alimentos ou rações animais, a fitase tem de combinar uma variedade de propriedades diferentes. De modo a estar apta para degradar ácido fítico no ambiente ácido de um estômago de animal, tem de estar activa a pH baixo, de um modo preferido, ao longo de uma vasta gama de valores de pH. Além disso, tem de possuir actividade específica elevada e, de um modo preferido, termoestabilidade elevada para permitir à proteína suportar temperaturas elevadas habitualmente utilizadas em preparação de rações, tais como granulados alimentares.

É também importante que a enzima possua vasta especificidade de substrato, permitindo-a hidrolisar não apenas fitato mas também produtos intermediários de degradação de fitato, tais como penta-fosfatos, tetra-fosfatos e tri-fosfatos de inositol. Estudos de degradação de fitato em porcos mostram que estes oligofosfatos de inositol, por outro lado, permanecem largamente insolúveis no intestino delgado e grosso e, deste modo, inacessíveis a fosfatases alcalinas produzidas pelo animal e microflora intestinal (Schlemmer U. *et al.*, *Arch. Anim. Nutr.* 55, 255-280 (2001)). Foram identificadas variações em perfis de especificidade de substrato de enzimas diferentes. Por exemplo, tri-fosfatos de inositol gerados pela fitase de *B. subtilis* são essencialmente resistentes a hidrólises adicionais por esta enzima [Kerovuo J. *et al.*, *Biochem J.* 352, 623-628 (2000)].

Noutro aspecto da invenção, é proporcionado um plasmídeo ou um sistema de vectores, ou um organismo transformado ou transgénico, compreendendo uma molécula de ácido nucleico isolada que codifica uma fitase nova como aqui descrita ou uma sua forma modificada.

Noutro aspecto, a presente invenção refere-se a organismos transgénicos modificados para expressar uma nova fitase, como aqui descrita ou uma sua forma modificada e, sendo, portanto, capaz de produzir uma fitase. A presente invenção proporciona ainda meios e métodos para a produção biotecnológica de fitases e descreve a sua utilização como suplementos alimentares.

Aspectos da presente invenção são apresentados nas reivindicações e no seguinte comentário.

Para facilidade de referência, estes e outros aspectos da presente invenção são agora discutidos nas secções com títulos apropriados. No entanto, os ensinamentos em cada secção não são necessariamente limitados a cada secção particular.

Como utilizados com referência à presente invenção, os termos "produzir", "produzindo", "produzido", "produzível", "produção" são sinónimos com os respectivos termos "preparar", "preparando", "preparado", "preparação", "gerado", "geração" e "preparável".

Como utilizados com referência à presente invenção, os termos "expressão", "expressa", "expressado" e "expressável" são sinónimos com os respectivos termos "transcrição", "transcreve", "transcrito" e "transcritível".

Como utilizados com referência à presente invenção, os termos “transformação” e “transfecção” referem-se a um método de introdução de sequências de ácidos nucleicos em hospedeiros, células hospedeiras, tecidos ou órgãos.

Outros aspectos relativos às sequências nucleotídicas que podem ser utilizadas nos métodos da presente invenção, incluem: uma construção compreendendo as sequências da presente invenção; um vector compreendendo as sequências para utilização na presente invenção; um plasmídeo compreendendo as sequências para utilização na presente invenção; uma célula transformada compreendendo as sequências para utilização na presente invenção; um tecido transformado compreendendo as sequências para utilização na presente invenção; um órgão transformado compreendendo as sequências para utilização na presente invenção; um hospedeiro transformado compreendendo as sequências para utilização na presente invenção; um organismo transformado compreendendo as sequências para utilização na presente invenção. A presente invenção inclui, também, métodos de expressão da sequência nucleotídica para utilização na presente invenção utilizando a mesma, tal como expressão numa célula hospedeira; incluindo métodos para transferir a mesma. A presente invenção inclui, ainda, métodos de isolamento da sequência nucleotídica, tal como isolamento de uma célula hospedeira.

Outros aspectos, considerando as sequências de aminoácidos para utilização na presente invenção, incluem: uma construção que codifica as sequências de aminoácidos para utilização na presente invenção; um vector que codifica as sequências de aminoácidos para utilização na presente invenção; um plasmídeo que codifica as sequências de aminoácidos para utilização na presente invenção; uma célula transformada que expressa as sequências de aminoácidos

para utilização na presente invenção; um tecido transformado que expressa as sequências de aminoácidos para utilização na presente invenção; um órgão transformado que expressa as sequências de aminoácidos para utilização na presente invenção; um hospedeiro transformado que expressa as sequências de aminoácidos para utilização na presente invenção; um organismo transformado que expressa as sequências de aminoácidos para utilização na presente invenção. A presente invenção inclui, também, métodos de purificação de sequências de aminoácidos para utilização na presente invenção utilizando os mesmos, tal como expressão numa célula hospedeira; incluindo métodos de transferência da mesma e, depois, purificação da referida sequência.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A **Figura 1** apresenta a análise por SDS PAGE da fitase recombinante de *Buttiauxella* P1-29 purificada por cromatografia em DEAE-Sepharose. A figura apresenta o espectro de varrimento de uma imagem fotográfica digital da pista contendo uma amostra da fitase *Buttiauxella*.

A **Figura 2** apresenta o perfil de pH da fitase de *Buttiauxella* P1-29.

A **Figura 3** apresenta a especificidade de substrato da fitase recombinante purificada de *Buttiauxella* P1-29 com fracções de fosfato de inositol de diferentes graus de fosforilação e substratos modelo. Abreviaturas: IP6 - ácido fítico, IP5, IP4 e IP3 - misturas de penta-, tetra- e trifosfatos de inositol isomérico, respectivamente. Fru P2 - frutose 1,6-difosfato, Fru P1 - frutose 6-fosfato.

A SEQ ID N°: 1 lista a sequência obtida para identificação da estirpe bacteriana.

A SEQ ID N°: 2 lista a sequência polinucleotídica compreendendo o gene de fitase de *Buttiauxella* P1-29.

A SEQ ID N°: 3 lista a sequência de aminoácidos do gene de fitase de *Buttiauxella* P1-29.

DIVULGAÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção caracteriza uma molécula de ácido nucleico isolada que codifica uma enzima compreendendo a sequência de aminoácidos correspondendo a fitase *Buttiauxella* sp. ou uma forma modificada, um homólogo, uma variante, um equivalente funcional ou um seu fragmento eficaz.

O termo “fitase” significa uma proteína ou polipéptido que é capaz de catalisar a hidrólise de ésteres de ácido fosfórico, incluindo fitato e libertando fosfato inorgânico. Algumas fitases são capazes de hidrolisar, além do fitato, pelo menos, alguns dos fosfatos de inositol de graus intermédios de fosforilação.

O termo “correspondendo a fitase *Buttiauxella* sp.” significa que a enzima não necessita de ser obtida de uma fonte de *Buttiauxella* sp. Em vez disso, a enzima, de um modo preferido, tem de possuir as mesmas características funcionais ou sequência como as da fitase *Buttiauxella* sp. Por exemplo, a Fitase *Buttiauxella* sp. pode ser uma variante derivada de uma

Buttiauxella spp., mas que não está naturalmente presente na espécie *Buttiauxella*.

A *Buttiauxella* spp. inclui *Buttiauxella* *agrestis*, *Buttiauxella* *brennerae*, *Buttiauxella* *ferragutiae*, *Buttiauxella* *gaviniae*, *Buttiauxella* *izardii*, *Buttiauxella* *noackiae*, *Buttiauxella* *warmboldiae*. As estirpes da espécie *Buttiauxella* estão disponíveis de DSMZ, o Centro Alemão de Recursos Nacionais para Material Biológico. As fitases são, de um modo preferido, identificadas a partir de *Buttiauxella* spp pelos métodos aqui descritos, por exemplo, hibridação com a SEQ ID N°: 2. As estirpes preferidas de *Buttiauxella* spp. para isolamento de polipéptidos e ou polinucleótidos da invenção são listadas nos exemplos.

Os termos “fitase do tipo selvagem” ou “tipo selvagem”, de acordo com a invenção, descrevem uma enzima fitase com uma sequência de aminoácidos encontrada na natureza.

Os termos “variante de enzima fitase”, “variante fitase” ou “variante”, de acordo com a invenção, descrevem uma enzima fitase com uma sequência de aminoácidos derivada da sequência de aminoácidos de uma fitase progenitora mas que difere por uma ou mais substituições, inserções e/ou deleções de aminoácidos, que em conjunto são referidas como “mutações”. É considerado que uma variante de enzima fitase pode também ser uma enzima fitase progenitora para outros ciclos de métodos de preparação de variantes fitase, tais como evolução molecular.

O termo “polipéptido(s) homólogo(s)”, de acordo com a presente invenção, aqui descrito também como “homólogos”, descreve polipéptidos, de um modo preferido, enzimas fitases

(i. e., “fitases homólogas” ou “enzimas homólogas”) com uma identidade de sequência de mais de 75% comparadas a uma primeira sequência de aminoácidos de polipéptidos/fitases/enzimas, de um modo preferido, possui, pelo menos, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de homologia de sequência.

O termo “seu equivalente funcional” significa que a enzima tem de possuir, aproximadamente, as mesmas características funcionais que as da fitase *Buttiauxella sp.* O termo “forma modificada” ou “variante” significa que a enzima foi modificada a partir da sua forma original mas continua a ter as mesmas características funcionais enzimáticas que as da fitase *Buttiauxella sp.* Em particular, os termos “variante” ou “forma modificada” incluem enzimas fitase com uma sequência de aminoácidos derivada da sequência de aminoácidos da fitase progenitora/tipo selvagem e possuindo uma ou mais substituições, inserções e/ou deleções de aminoácidos, que em conjunto são referidas como mutações. As formas modificadas ou variantes podem apresentar características enzimáticas alteradas comparadas à enzima progenitora. De um modo preferido, as formas modificadas ou variantes possuem um ou mais dos seguintes fenótipos melhorados: termoestabilidade aumentada e/ou; uma estabilidade proteolítica (por exemplo, pepsina) aumentada e/ou; uma actividade específica aumentada e/ou; especificidade de substrato mais vasta e/ou; uma actividade sobre uma gama de pH mais vasta. O termo fragmento “funcional” ou “eficaz” significa um fragmento ou porção da fitase *Buttiauxella sp.* que mantém, aproximadamente, a mesma função ou efeito enzimático.

De um modo preferido, a enzima fitase codificada pela molécula de ácido nucleico isolada deste aspecto da presente invenção possui a mesma sequência ou uma sequência que é, pelo

menos, 80% idêntica (homóloga) à da fitase *Buttiauxella sp.*

De um modo adequado, a enzima codificada pela molécula de ácido nucleico isolada compreende a sequência de aminoácidos como apresentada em SEQ ID N°: 3 ou uma sequência possuindo, pelo menos, 80% de identidade (homologia) a esta. Numa forma de realização preferida, a invenção proporciona uma molécula de ácido nucleico isolada e/ou purificada que codifica para polipéptido possuindo a sequência de aminoácidos como exposta em SEQ ID N°: 3 ou uma sequência possuindo, pelo menos, 80% de identidade (homologia) a esta. Quando se refere a SEQ ID N°: 3 e polipéptidos compreendendo a SEQ ID N°: 3, é considerado que isto também se refere a polipéptidos que são co- ou pós-traducionalmente processados durante a expressão, por exemplo, por clivagem de péptidos de sinal. A clivagem pós-traducional pode também ocorrer no terminal C. Portanto, numa forma de realização preferida, o seu fragmento funcional é o polipéptido maduro produzido pelo hospedeiro nativo ou um hospedeiro de expressão apropriado adequado.

Noutra forma de realização, a fitase codificada pela molécula de ácido nucleico isolada é caracterizada por ser derivada da estirpe *Buttiauxella sp.* P1-29 depositada sob o número de acesso NCIMB 41248.

Numa forma de realização preferida, a invenção refere-se a uma fitase codificada pela molécula de ácido nucleico isolada da invenção, de acordo com qualquer forma de realização do primeiro aspecto da invenção, que compreende uma ou mais mutações nas seguintes posições (numeração de acordo com a numeração em SEQ ID N°: 3):

59, 70, 122, 125, 167, 193, 197, 204, 209, 211, 221, 223, 225, 240, 242, 244, 268, 281, 289, 294, 303, 336, 351.

Estas posições são caracterizadas por mutagênese da enzima nestas posições levando a um melhoramento nas características de enzima pretendida.

As seguintes substituições podem ser variantes preferidas:

K 59 A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W ou Y;
T 70 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W ou Y;
A 122 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y;
D 125 A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W ou Y;
T 167 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W ou Y;
H 193 A, C, D, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W ou Y;
F 197 A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W ou Y;
T 204 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W ou Y;
T 209 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W ou Y;
A 211 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W ou Y;
G 221 A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W ou Y;
I 223 A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W ou Y;
S 225 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W ou Y;
K 240 A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W ou Y;
A 242 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W ou Y;
D 244 A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W ou Y;
A 268 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W ou Y;
L 281 A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W ou Y;
Q 289 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W ou Y;
A 294 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W ou Y;
N 303 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W ou Y;
I 336 A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W ou Y;

N 351 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W ou Y.

Por “mutações conservadoras” entendem-se mutações em resíduos de aminoácidos que são conservadores em termos das características de aminoácidos comparados ao resíduo de aminoácidos indicado. As características de aminoácidos incluem o tamanho do resíduo, hidrofobicidade, polaridade, carga, valor de pK e outras características de aminoácido conhecidas na técnica. As mutações conservadoras preferidas são listadas abaixo como substituições conservadoras.

Numa forma de realização particularmente preferida, as mutações são em uma ou mais das seguintes posições: K59; T167; K240; T167; K240; D244; Q289; T209 e F197.

As mutações preferidas nestas posições específicas são acima listadas, as mutações mais preferidas incluem: K59E; T167V; K240T; T167I; K240E; D244C; Q289Y; T209K e F197S.

Numa forma de realização preferida adicional, é proporcionada uma molécula de ácido nucleico isolada que codifica para uma fitase compreendendo uma combinação de mutações seleccionadas do grupo consistindo de:

D125E/H193R;

A294E/N303K;

T167I/K240T;

D223E/K240E/N351D;

T167I/K240T/A294E/N303K;

T167I/K240E/A242S/A294E/N303K;

A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A294E/N303K;

A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A242S/S281L/Q289Y/A294E/

N303K;
A122T/D125E/H193R/F197S/T209K/A211P/S221N/G225A/K240E/A294E/
N303K;
D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/
A294E/N303K;
A122T/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/
A294E/310 N303K/I336F e
N70Y/D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/
Q289H/A294E/N303K.

Como consequência, uma fitase preferida codificada pela molécula de ácido nucleico isolada, de acordo com a presente invenção, é uma variante compreendendo a sequência de aminoácidos listada como SEQ ID N°: 3 (ou seu homólogo, de um modo preferido, a fitase é caracterizada por ser derivada da estirpe *Buttiauxella* sp. P1-29 depositada sob o número de acesso NCIMB 41248 ou seu homólogo), excepto tendo uma ou mais das mutações de aminoácidos listadas acima ou uma das combinações de mutações listadas acima.

Nestas formas de realização, a nomenclatura indica uma fitase compreendendo a sequência de aminoácidos exposta em SEQ ID N°: 3 com as mutações indicadas por referência às posições dos aminoácidos em SEQ ID N°: 3. A nomenclatura é descrita abaixo em mais pormenor.

De um modo adequado, estas variantes apresentam características melhoradas no que se refere a qualquer das seguintes: estabilidade de temperatura, gama de pH, estabilidade de pepsina, actividade específica, especificidade de substrato e especificidade de substrato mais vasta. Os métodos adequados para determinar estas características são aqui divulgados.

Em particular, os melhoramentos nas características de fitase estão dirigidos à estabilidade de enzima sob condições de processamento de alimentos e rações, à estabilidade de enzima durante o trânsito estomacal e à actividade e estabilidade de enzima em estômago de humanos ou animais e/ou tracto intestinal, fazendo as variantes melhoradas particularmente adequadas para utilização como suplementos alimentares. Deste modo, esses melhoramentos compreendem, entre outros parâmetros, o aumento da estabilidade a temperaturas elevadas, de um modo preferido, a temperaturas acima de 65 °C, o aumento da estabilidade contra a digestão proteolítica, de um modo preferido, protease do tracto digestivo, tal como pepsina, o aumento da actividade catalítica a pH baixo, de um modo preferido, actividade catalítica abaixo de pH 5,5 e a eficiência geral de libertação de grupos fosfato a partir de fitato e, de um modo preferido, além disso, fosfatos de inositol.

Nomenclatura

Na presente descrição e reivindicações são utilizados os códigos convencionais, uma letra e três letras, para resíduos de aminoácidos. Para facilidade de referência, as mutações em variantes de enzima são descritas pela utilização da seguinte nomenclatura: resíduo de aminoácidos na enzima progenitora; posição; resíduo(s) de aminoácidos substituído(s). De acordo com esta nomenclatura, a substituição de, por exemplo, um resíduo de alanina para um resíduo de glicina na posição 20 é indicado como Ala20Gly ou A20G. A deleção de alanina na mesma posição é apresentada como Ala20* ou A20*. A inserção de um resíduo de aminoácido adicional (e. g., uma glicina) é indicada como

Ala20AlaGly ou A20AG. A deleção de um fragmento consecutivo de resíduos de aminoácidos (e. g., entre alanina na posição 20 e glicina na posição 21) é indicada como $\Delta(\text{Ala20-Gly21})$ ou $\Delta(\text{A20-G21})$. Quando uma sequência enzimática progenitora contém uma deleção em comparação à sequência enzimática utilizada para numerar uma inserção nessa posição (e. g., uma alanina na posição removida 20) é indicada como *20Ala ou *20A. As mutações múltiplas são separadas por um sinal mais ou uma barra. Por exemplo, duas mutações em posições 20 e 21 substituindo alanina e ácido glutâmico por glicina e serina, respectivamente, são indicados como A20G+E21S ou A20G/E21S. Quando um resíduo de aminoácido numa dada posição é substituído com dois ou mais resíduos de aminoácidos alternativos, estes resíduos são separados por uma vírgula ou uma barra. Por exemplo, substituição de alanina na posição 30 por glicina ou ácido glutâmico é indicada como A20G,E ou A20G/E, ou A20G, A20E. Quando uma posição adequada para modificação é aqui identificada sem ser sugerida qualquer modificação específica, deve ser entendido que qualquer resíduo de aminoácido pode ser substituído para o resíduo de aminoácido presente na posição. Deste modo, por exemplo, quando uma modificação de uma alanina na posição 20 é mencionada mas não especificada, deve ser entendido que a alanina pode ser removida ou substituída para qualquer outro resíduo de aminoácido (i. e., qualquer um de R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V).

De um modo adequado, a fitase ou equivalente funcional codificada pela molécula de ácido nucleico isolada da presente invenção, é caracterizada por a referida fitase possuir uma actividade específica de, pelo menos, 300 U/mg, em que a referida actividade específica é determinada por incubação da referida fitase numa solução contendo fitato 2 mM, CaCl_2 0,8 mM

em tampão de acetato de sódio 200 mM a pH 3,5 como pormenorizado no Exemplo 1. A fitase codificada pela molécula de ácido nucleico isolada da presente invenção pode também ser, de um modo adequado, caracterizada por a referida fitase possuir uma actividade máxima a, aproximadamente, pH 4-4,5 em que a referida actividade é determinada por incubação da referida fitase numa solução contendo fitato 2 mM, CaCl_2 0,8 mM em tampão de acetato de sódio 200 mM. A fitase codificada pela molécula de ácido nucleico isolada da presente invenção pode também ser, de um modo adequado, caracterizada por a referida fitase possuir 40% ou mais de uma actividade máxima observada a pH 2,5 e 5,5, em que o tampão de hidrocloreto de glicina é utilizado para determinar actividade a pH 2,5.

De um modo adequado, numa forma de realização, a fitase codificada pela molécula de ácido nucleico isolada da presente invenção é caracterizada por a referida fitase possuir uma actividade específica de 330 U/mg ou superior, em que a referida actividade específica é determinada por incubação da referida fitase numa solução contendo fitato 2 mM, CaCl_2 0,8 mM em tampão de acetato de sódio 200 mM a pH 3,5. Noutra forma de realização, a fitase codificada pela molécula de ácido nucleico isolada da presente invenção pode também ser, de um modo adequado, caracterizada por a referida fitase possuir dois máximos de actividade a, aproximadamente, pH 3 e pH 4-4,5, em que a referida actividade é determinada por incubação da referida fitase numa solução contendo fitato 2 mM, CaCl_2 0,8 mM em tampão de acetato de sódio 200 mM.

Noutro aspecto, a invenção proporciona uma molécula de ácido nucleico ou sequência nucleotídica isolada e/ou purificada que codifica para a enzima compreendendo a sequência de aminoácidos

correspondendo a fitase *Buttiauxella sp.* ou um seu homólogo. De um modo adequado, a referida molécula de ácido nucleico isolada e/ou purificada codifica um polipéptido compreendendo a sequência de aminoácidos como apresentada em SEQ ID N°: 3 ou uma sequência possuindo, pelo menos, 80% de identidade (homologia) a esta ou um seu fragmento eficaz. Numa forma de realização, a molécula de ácido nucleico codifica um polipéptido compreendendo a SEQ ID N°: 3 e incluindo mutações nas posições preferidas aqui listadas ou quaisquer das mutações específicas ou combinações de mutações aqui listadas. Noutra forma de realização, a invenção proporciona uma molécula de ácido nucleico isolada e/ou purificada compreendendo uma sequência nucleotídica que é a mesma ou é complementar ou contém quaisquer substituições de codão adequadas para qualquer destas de SEQ ID N°: 2 ou compreende uma sequência que possui, pelo menos, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de homologia de sequência com SEQ ID N°: 2.

Ainda noutro aspecto adicional, a invenção refere-se a uma sequência nucleotídica e à utilização de uma sequência nucleotídica, apresentada como:

- (a) a sequência nucleotídica apresentada como SEQ ID N°: 2,
- (b) uma sequência nucleotídica que é uma variante, homólogo, derivado ou fragmento da sequência nucleotídica apresentada como SEQ ID N°: 2;
- (c) uma sequência nucleotídica que é o complemento da sequência nucleotídica exposta em SEQ ID N°: 2;
- (d) uma sequência nucleotídica que é o complemento de uma

variante, homólogo, derivado ou fragmento da sequência nucleotídica apresentada como SEQ ID N°: 2;

(e) uma sequência nucleotídica que é capaz de hibridar à sequência nucleotídica exposta em SEQ ID N°: 2;

(f) uma sequência nucleotídica que é capaz de hibridar a uma variante, homólogo, derivado ou fragmento da sequência nucleotídica apresentada como SEQ ID N°: 2;

(g) uma sequência nucleotídica que é o complemento de uma sequência nucleotídica que é capaz de hibridar à sequência nucleotídica exposta em SEQ ID N°: 2;

(h) uma sequência nucleotídica que é o complemento de uma sequência nucleotídica que é capaz de hibridar a uma variante, homólogo, derivado ou fragmento da sequência nucleotídica apresentada como SEQ ID N°: 2;

(i) uma sequência nucleotídica que é capaz de hibridar ao complemento da sequência nucleotídica exposta em SEQ ID N°: 2;

j) uma sequência nucleotídica que é capaz de hibridar ao complemento de uma variante, homólogo, derivado ou fragmento da sequência nucleotídica apresentada como SEQ ID N°: 2.

Um nucleótido é considerado para hibridar a um dos nucleótidos acima (e), (f), (g), (h), (i) ou (j), se for capaz de hibridar sob condições restritivas médias, de um modo mais preferido, restringência alta, de um modo ainda mais preferido,

sob condições restritivas muito altas.

Para preparar uma hibridação de transferência molecular padrão, podem ser utilizados protocolos de biologia para transferência (e. g., transferência de Southern para hibridações de ADN). A quantidade de ADN alvo depende da abundância relativa da sequência alvo. Se uma sequência alvo pura é para ser utilizada, são preferidos entre 1 e 5 picogramas de ADN por quilobase de polinucleótidos. Tipicamente, o limite de detecção é de cerca de 0,5 pg de ADN para uma sonda radioactiva com actividade específica de 10^9 dpm/mg., que é equivalente a um gene de cópia simples de 500 bp, em comprimento, em 3,3 mg de ADN genómico de um genoma complexo (e. g., humano). Na prática irá utilizar-se aprox. 10 mg de ADN genómico - por exemplo, para rastrear organismos, tais como microrganismos, que contêm uma fitase que codifica polinucleótidos da invenção. Se o ADN alvo é bacteriano ou, por exemplo, um plasmídeo, terá de diluir o ADN, como consequência para evitar sobreexposição. O ADN alvo é transferido, e. g., por transferência de gota, ou via transferência a partir de electroforese em gel. As condições preferidas são descritas em *"Membrane Transfer and Detection Methods"*, Amersham International plc, RU.- PI/162/85/1). De um modo preferido, é utilizada a membrana de nylon Hybond N+ positivamente carregada (Amersham Life Science). A sonda é, de um modo preferido, preparada de acordo com o kit de rotulagem *Pharmacia's 'Ready to Go DNA™* para preparar uma sonda de $> 1 \times 10^9$ dpm/micrograma. A sonda é utilizada em tampão de hibridação numa concentração de 1×10^6 dpm por mililitro de tampão de hibridação. As transferências são, de um modo preferido, pré-hibridadas em tampão de hibridação (tampão 6x SSC, 5x solução de denhardt e SDS 0,5% e ADN de esperma de salmão desnaturado 100 mg/mL.), durante uma hora, a 65 °C,

seguida de hibridação em tampão de hibridação contendo a sonda rotulada desnaturada com agitação, durante 12 horas, a 65 °C. A(s) transferência(s) é(são), então, lavada(s) com um volume de tampão de lavagem adequado (tipicamente 50 mL) em 2 x SSC, SDS 0,1%, durante 30 minutos, a 65 °C, seguido por uma segunda lavagem num volume de tampão de lavagem adequado (tipicamente 50 mL) no mesmo tampão de lavagem (2 x SSC, SDS 0,1%) para restringência média de lavagem, ou 0,1% x SSC, SDS 0,1%, durante 10 minutos, a 65 °C (alto rigor de restringência), a segunda lavagem pode ser repetida a 70 °C para uma lavagem de muito alta restringência.

A sequência nucleotídica da presente invenção pode compreender sequências que codificam para SEQ ID N°: 3 ou um seu fragmento eficaz ou uma variante, forma modificada, homólogo ou seu derivado.

Em particular, a invenção proporciona um plasmídeo ou sistema de vectores compreendendo uma fitase como aqui descrita ou um homólogo ou seu derivado. De um modo preferido, o plasmídeo ou sistema de vectores compreende uma sequência de ácidos nucleicos como exposta em SEQ ID N°: 2 ou uma sequência que é, pelo menos, 80% homóloga a esta ou um seu fragmento eficaz. De um modo adequado, o plasmídeo ou sistema de vectores é um vector de expressão para a expressão de qualquer das enzimas codificadas por uma sequência de ácido nucleico como exposta em qualquer de SEQ ID N°: 2 ou uma sequência que é, pelo menos, 80% homóloga (idêntica) a esta num microrganismo. São aqui descritos os vectores de expressão adequados. Além disso, a invenção proporciona um plasmídeo ou sistema de vectores para expressão de qualquer das enzimas ou variantes ou fragmentos funcionais modificados aqui descritos. São aqui descritos os

vectores de expressão adequados.

Variantes fitase

A presente invenção é feita para o melhoramento das características de uma fitase progenitora por modificação de um ou mais resíduos de aminoácidos da sequência de aminoácidos da fitase progenitora.

As enzimas fitase utilizadas como enzimas progenitoras, de acordo com a presente invenção, incluem fitases do tipo selvagem a partir de bactérias, em particular, de um modo preferido, fitases obtidas de ou derivadas de *Buttiauxella sp.* tendo a sequência de aminoácidos como dada em SEQ ID N°: 3 ou uma sequência de aminoácidos com uma identidade a SEQ ID N°: 3 de mais de 80%, de um modo preferido, de mais de 90%, de um modo mais preferido, de mais de 95%, 96%, 97%, 98% de um modo preferido, de mais de 99% (*i. e.*, polipéptidos homólogos).

As variantes de enzima fitase melhoradas codificadas pelas moléculas de ácido nucleico isoladas da invenção, de um modo preferido, possuem uma identidade de uma identidade a SEQ ID N°: 3 de mais de 80%, de um modo mais preferido, de mais de 90%, de um modo mais preferido, de mais de 95%, 96%, 97%, 98%, de um modo preferido, de mais de 99%. No entanto, é também descrito que as variantes podem ser heterólogas, (*i. e.*, não homólogas) à SEQ ID N°: 3. Por exemplo, as variantes produzidas por técnicas de recombinação, tais como recombinação *exo*-mediada ou por inversão de família, podem resultar em variantes, apesar de preparadas utilizando a fitase progenitora, de acordo com a presente invenção, podem possuir menos de 75% de homologia.

Os alinhamentos de sequências bem como a determinação de identidades de sequência podem, de um modo adequado, ser feitas por meio de programas de computador conhecidos na técnica, tal como GAP, proporcionado no pacote de programa GCG (Needleman, S. B. e Wunsch, C. D., (1970), *Journal of Molecular Biology*, 48, p. 443-453). O GAP pode ser utilizado com os seguintes conjuntos para comparação de sequências de polipéptidos: penalidade de criação GAP de 3,0 e penalidade de extensão GAP de 0,1. Os alinhamentos de sequências são utilizados, por exemplo, para determinar as posições correspondentes em polipéptidos homólogos.

As enzimas fitase foram caracterizadas após expressão heteróloga em um ou mais dos seguintes hospedeiros de expressão: *Escherichia coli* K12; *Bacillus subtilis*; *Saccharomyces cerevisiae*. Podem ser utilizados outros hospedeiros de expressão.

Os melhoramentos nas características de fitase de acordo com a presente invenção são direccionados à utilização em processamento de alimentos e rações bem como para a utilização como aditivo em produtos alimentares e rações. Em particular, os melhoramentos são direccionados à estabilidade sob condições de processamento de alimentos e rações, à estabilidade durante o trânsito estomacal e à actividade e estabilidade em estômagos humanos ou animais e/ou tracto intestinal. Esses melhoramentos compreendem, entre outros parâmetros, o aumento da estabilidade a temperaturas elevadas, de um modo preferido, a temperaturas acima de 65 °C, o aumento da estabilidade contra a digestão proteolítica, de um modo preferido, protease do tracto digestivo, o aumento da actividade catalítica a pH baixo, de um

modo preferido, actividade catalítica abaixo de pH 5,5 e a eficiência geral de libertação de grupos fosfato a partir de fitato.

O aumento da estabilidade a elevadas temperaturas é quantificado pela temperatura de inactivação da enzima. A temperatura de inactivação é definida como a temperatura a que a actividade residual de uma enzima fitase após incubação durante uma certa duração e subsequente arrefecimento à temperatura ambiente é 50% da actividade residual da mesma enzima fitase incubada para a mesma duração sob as mesmas condições à temperatura ambiente. As diferenças de termoestabilidade são as diferenças em °C entre as temperaturas de inactivação de duas enzimas.

As posições e/ou regiões a ser mutadas para obter características melhoradas foram verificadas por análise da sequência e da estrutura das fitases tipo selvagem bem como por mutagénese de enzimas progenitoras, em particular, por introdução de mutações para a sequência de aminoácidos do tipo selvagem como dada em SEQ ID N°: 3 e rastreando variantes de enzima com características melhoradas. Assim, certas regiões bem como as posições dentro das enzimas progenitoras foram identificadas por serem significativas para melhorar as características das enzimas fitase.

Portanto, a invenção refere-se a moléculas de ácido nucleico isoladas que codificam para variantes fitase com características melhoradas que, quando comparadas à fitase progenitora, compreendem mutações em uma ou mais das seguintes posições (numeração de acordo com a numeração em SEQ ID N°: 3):

59, 70, 122, 125, 167, 193, 197, 204, 209, 211, 221, 223, 225, 240, 242, 244, 268, 281, 289, 294, 303, 336, 351.

e/ou nas posições correspondentes numa fitase homóloga à fitase como apresentada numa sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 3. Estas posições são caracterizadas por a mutagénese destas posições levar a um melhoramento nas características de enzimas.

K59E; T167V; K240T; T167I; K240E; D244C; Q289Y; T209K e F197S.

ou mutações conservadoras em cada posição.

As combinações de mutações específicas preferidas incluem:

D125E/H193R;
A294E/N303K;
T167I/K240T;
D223E/K240E/N351D;
T167I/K240T/A294E/N303K;
T167I/K240E/A242S/A294E/N303K;
A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A294E/N303K;
A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A242S/S281L/Q289Y/A294E/
N303K;
A122T/D125E/H193R/F197S/T209K/A211P/S221N/G225A/K240E/A294E/
N303K;
D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/
A294E/N303K;
A122T/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/
A294E/N303K/I336F e
N70Y/D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/
Q289H/A294E/N303K.

Métodos de preparação de variantes fitase - apenas para ilustração

Numa vasta forma de realização, a descrição proporciona métodos de preparação de variante(s) de enzima fitase.

Numa forma de realização preferida, o método aqui descrito de preparação de uma variante de enzima fitase compreende as seguintes etapas sequenciais:

a) Seleccionar, pelo menos, uma enzima fitase progenitora, em que, pelo menos, uma enzima fitase progenitora é seleccionada de i) um polipéptido compreendendo a sequência de aminoácidos correspondendo a uma fitase *Buttiauxella* sp., ou uma forma modificada, um polipéptido homólogo, uma variante, um equivalente funcional ou um seu fragmento eficaz, como aqui descrito ou ii), pelo menos, uma variante de enzima fitase como aqui descrito;

b) Gerar, pelo menos, uma variante fitase introduzindo, pelo menos, uma alteração da referida enzima fitase progenitora que é uma inserção, uma remoção ou uma substituição ou sua combinação, de um resíduo de aminoácido na referida enzima fitase progenitora para obter, pelo menos, uma variante de enzima fitase;

c) Rastrear para a referida, pelo menos, uma variante de enzima fitase para identificar uma variante de enzima fitase melhorada, que comparada à enzima fitase progenitora possui propriedade/propriedades melhorada(s) seleccionada(s) de:

- i. maior estabilidade térmica e/ou
- ii. actividade específica e/ou
- iii. estabilidade proteolítica

d) Preparar a referida variante de enzima fitase melhorada, de um modo preferido, para produzir uma variante de enzima fitase isolada e/ou purificada.

Numa forma de realização preferida, durante a etapa b) uma população de variantes de enzima fitase é gerada e na etapa c), pelo menos, é rastreada uma proporção da referida população de variantes de enzima fitase.

Numa forma de realização preferida, a etapa a) compreende submeter uma sequência nucleotídica, de acordo com as reivindicações 11 a 13, que codifica uma enzima fitase progenitora a mutagénese e a etapa b) compreende expressar a sequência nucleotídica mutada obtida na etapa (a) numa célula hospedeira e a etapa c) compreende rastrear células hospedeiras ou seu(s) extracto(s), para uma variante de enzima fitase melhorada com a(s) referida(s) propriedade/propriedades melhorada(s).

Numa forma de realização adicional após a etapa c) e, opcionalmente, d), compreende ainda, pelo menos, um ciclo subsequente de etapas repetidas a) a c) e, opcionalmente, d), em que, de um modo preferido, no(s) referido(s) ciclo(s) subsequente(s), pelo menos, uma enzima fitase progenitora da etapa a) é seleccionada da referida, pelo menos, uma variante de enzima fitase e/ou uma variante fitase melhorada preparada de acordo com o método.

Numa forma de realização adicional, de um modo preferido, a etapa c) compreende rastrear as células hospedeiras que expressam uma variante de enzima fitase melhorada que comparada i) à referida enzima fitase progenitora e/ou ii) um polipéptido compreendendo a SEQ ID N°: 3 do seu fragmento funcional, possui uma diferença de estabilidade térmica de, pelo menos, 2,5.

Numa forma de realização adicional, a etapa c) compreende rastrear as células hospedeiras que expressam uma variante de enzima fitase melhorada que comparada i) à referida enzima fitase progenitora e/ou ii) um polipéptido compreendendo a SEQ ID N°: 3 do seu fragmento funcional, possui estabilidade de pepsina de, pelo menos, 30.

Numa forma de realização adicional, a etapa c) compreende rastrear as células hospedeiras que expressam uma variante de enzima fitase melhorada que comparada i) à referida enzima fitase progenitora e/ou ii) um polipéptido compreendendo a SEQ ID N°: 3, possui uma razão de actividade específica quando comparada à fitase codificada pela SEQ ID N°: 3 de, pelo menos, 110.

A descrição também proporciona um método de preparação de uma variante de enzima fitase, cujo método compreende:

a) Seleccionar uma enzima fitase progenitora, em que a enzima fitase progenitora é seleccionada de

- i. uma enzima fitase progenitora com, pelo menos, 75% de homologia à SEQ ID N°: 3 ou seu fragmento funcional
- ii. uma enzima fitase progenitora derivada de *Buttiauxella spp.*

iii. pelo menos uma variante de enzima fitase

b) Fazer, pelo menos, uma alteração que é uma inserção, uma remoção ou uma substituição de um resíduo de aminoácido na enzima fitase progenitora para obter uma variante de enzima fitase,

c) Rastrear uma variante de enzima fitase, que comparada à enzima fitase progenitora, possui características melhoradas, como aqui descritas, de um modo preferido, seleccionadas de um ou mais de:

- i. maior estabilidade térmica e/ou
- ii. actividade específica e/ou
- iii. estabilidade proteolítica e/ou

d) Preparar a variante de enzima fitase

Opcionalmente, pelo menos, as etapas a) a c) podem ser repetidas em um ou mais ciclos subsequentes (iterativos). Portanto, é considerado que a enzima fitase progenitora é uma variante de enzima fitase preparada por ciclos prévios do método acima a) a c).

Numa forma de realização adicional, a descrição proporciona um método de preparação de uma variante fitase, compreendendo as seguintes etapas:

(a) proporcionar uma enzima fitase progenitora, seleccionada de

(i) uma enzima fitase com, pelo menos, 75% de homologia à

SEQ ID N°: 3 ou seu fragmento funcional

(ii) uma enzima fitase derivada de *Buttiauxella spp.*

(iii) pelo menos, uma variante de enzima fitase

(b) gerar uma população de variantes fitase por alteração da fitase progenitora, De um Modo Preferido, a(s) referida(s) alteração(ões) é/são obtida(s) através de inserção, remoção ou substituição de, pelo menos, um resíduo de aminoácidos na fitase progenitora ou qualquer sua combinação.

(c) rastrear a população para uma variante fitase que comparada à enzima fitase progenitora possui características melhoradas, como aqui descritas, de um modo preferido, seleccionada de um ou mais de:

(i) maior estabilidade térmica e/ou

(ii). maior actividade específica e/ou

(iii) maior estabilidade proteolítica,

(d) seleccionar uma ou mais variantes fitase a partir da população de fitases.

(e) repetir, opcionalmente, as etapas (a) a (c) ciclicamente e, de um modo preferido, em que as variantes fitase seleccionadas num ciclo são utilizadas como primeiras fitases no ciclo seguinte.

Numa forma de realização adicional, a descrição proporciona um método de preparação de uma variante de enzima fitase, cujo método compreende:

a) Submeter uma sequência nucleotídica que codifica uma enzima fitase progenitora a mutagénese, em que a enzima fitase progenitora é seleccionada de

- i. uma enzima fitase progenitora com, pelo menos, 75% de homologia à SEQ ID N°: 3 ou seu fragmento funcional
- ii. uma enzima fitase progenitora derivada de *Buttiauxella spp.*
- iii. pelo menos, uma variante de enzima fitase

b) Expressar a sequência nucleotídica mutada obtida na etapa (a) numa célula hospedeira, e

c) Rastrear as células hospedeiras que expressam para uma variante de enzima fitase que, comparada à enzima fitase progenitora, possui características melhoradas, como aqui descritas, de um modo preferido, seleccionadas de um ou mais de:

- i) maior estabilidade térmica e/ou
- ii) maior actividade específica e/ou
- iii) maior estabilidade proteolítica e/ou

d) Preparar a variante de enzima fitase expressa pela célula hospedeira.

Opcionalmente, as etapas a) a c), opcionalmente incluindo d), podem ser repetidas em um ou mais ciclos subsequentes (iterativos).

Numa forma de realização adicional, a descrição proporciona um método de preparação de uma variante fitase, compreendendo as

seguintes etapas:

(a) submeter uma sequência nucleotídica que codifica uma enzima fitase progenitora a mutagénese para gerar uma população de variantes de nucleótidos alterados, em que, de um modo preferido, a(s) referida(s) alteração(ões) é/são obtida(s) através de uma inserção, remoção ou substituição de, pelo menos, um resíduo de aminoácido na fitase progenitora ou qualquer sua combinação e, em que a enzima fitase progenitora é seleccionada de

- (i) uma enzima fitase com, pelo menos, 75% de homologia à SEQ ID N°: 3 ou seu fragmento funcional
- (ii) uma enzima fitase derivada de *Buttiauxella spp.*
- (iii) pelo menos, uma variante de enzima fitase

(b) expressar a população de variantes nucleotídicas obtidas é a etapa (a) numa população de célula hospedeiras correspondentes, e

(c) rastrear a população de uma variante fitase que, comparada à enzima fitase progenitora, possui características melhoradas, como aqui descritas, de um modo preferido, seleccionadas de um ou mais de:

- (i) maior estabilidade térmica e/ou
- (ii) maior actividade específica e/ou
- (iii) maior estabilidade proteolítica,

(d) seleccionar uma ou mais variantes fitase a partir da população de fitases.

(e) opcionalmente, repetir as etapas (a) a (c), ciclicamente e, de um modo preferido, em que as variantes fitase seleccionadas num ciclo são utilizadas como primeiras fitases no seguinte ciclo.

Quando apropriado, nos métodos de preparação de uma variante de enzima fitase acima, a referida sequência nucleotídica é, de um modo preferido, uma sequência de ADN.

A sequência nucleotídica é, de um modo preferido, uma molécula de ácido nucleico isolada e/ou purificada ou sequência nucleotídica que codifica para a enzima compreendendo a sequência de aminoácidos correspondente à fitase *Buttiauxella sp.*, ou um seu homólogo, como aqui descrito.

A progenitora fitase é, de um modo preferido, seleccionada de SEQ ID N°: 3 ou seu fragmento funcional ou um homólogo da fitase *Buttiauxella sp* como divulgada em SEQ ID N°: 3, como aqui descrito.

Nas formas de realização acima da descrição, que se referem a métodos de preparação de variante de enzima fitase, a enzima fitase progenitora/nucleótido que codifica a enzima fitase progenitora/nucleótido é, de um modo preferido, uma fitase do tipo selvagem.

No entanto, noutra, a progenitora pode ser uma variante preparada por ciclos prévios de mutagénese, i. e., numa forma de realização, os métodos de preparação de variante de enzima fitase são iterativos, em que as etapas a) a c) (opcionalmente incluindo a etapa d)) são repetidas, pelo menos, mais do que uma vez. Nessas formas de realização, os métodos de mutagénese

utilizados no primeiro ciclo de mutagénese é, de um modo preferido, PCR propensa a erros, de um modo mais preferido, limite de erro do PCR. Os ciclos subsequentes podem também ser PCR propensa a erros, de um modo mais preferido, limite de erro do PCR, mas podem alternativamente ser mutagénese baseada em recombinação, em que grupos de, pelo menos, duas variantes independentes melhoradas são identificadas num primeiro ciclo de mutagénese são, durante um segundo ou subsequente ciclo de mutagénese recombinados para dar, pelo menos, uma variante recombinante (e. g., utilizando inversão de família ou métodos de reacção em cadeia recombinante).

Será evidente para o especialista na técnica que métodos de mutagénese alternativos podem também ser utilizados, incluindo concepção racional, mutagénese de varrimento local ou mutagénese induzida quimicamente/radiação.

Nas formas de realização da descrição acima, que se refere a métodos de preparação de variante de enzima fitase, a variante de enzima fitase é, de um modo preferido, rastreada para maior estabilidade térmica.

Nas formas de realização da descrição acima, que se refere a métodos de preparação de variante de enzima fitase, a variante de enzima fitase é, de um modo preferido, rastreada para, pelo menos, um parâmetro único, de um modo preferido, seleccionada de maior estabilidade térmica, maior estabilidade proteolítica ou maior actividade específica, de um modo muito preferido, maior estabilidade térmica.

De um modo preferido, o rastreio para o referido primeiro parâmetro, é realizado em, pelo menos, um primeiro ciclo de

mutagénese compreendendo, pelo menos, as etapas a) a c), em que c) compreende, pelo menos, o rastreio do referido primeiro parâmetro. Este primeiro ciclo de mutagénese pode, então, ser seguido por outros ciclos (iterativos) de mutagénese e selecção compreendendo as etapas a) a c) (opcionalmente incluindo d)) em que a selecção nos referidos outros ciclos pode ser seleccionada do mesmo parâmetro de selecção como utilizado na etapa c) do referido primeiro ciclo ou, alternativamente, um parâmetro diferente.

Durante os ciclos iterativos dos métodos de preparação de uma variante de enzima fitase acima, de um modo preferido, o referido primeiro parâmetro é seleccionado de maior estabilidade térmica, maior estabilidade proteolítica ou maior actividade específica, de um modo muito preferido, maior estabilidade térmica. De um modo preferido, quando um primeiro ciclo de mutagénese foi realizado para seleccionar variantes com uma maior estabilidade térmica, durante um subsequente ciclo(s) (iterativo) de mutagénese compreendendo as etapas a) a c), o referido parâmetro é seleccionado de maior estabilidade térmica, maior estabilidade proteolítica ou maior actividade específica, de um modo muito preferido, maior estabilidade proteolítica ou maior actividade específica.

Nas formas de realização da descrição acima, que se refere a métodos de preparação de variante de enzima fitase, a variante de enzima fitase é, de um modo preferido, rastreada para maior estabilidade térmica e maior estabilidade proteolítica e maior actividade específica em, pelo menos, um ciclo de mutagénese (etapas a) a c), de um modo preferido, mais de um ciclo, i. e., ciclos iterativos de selecção.

A enzima fitase progenitora é, de um modo preferido, derivada de *Buttiauxella* Pl-29.

Nos métodos de preparação de uma variante de enzima fitase, cujo método compreende submeter uma sequência de ADN que codifica uma enzima fitase progenitora a mutagénese, a sequência de ADN que codifica a enzima fitase progenitora é, de um modo preferido, submetida a mutagénese aleatória, de um modo mais preferido, PCR propensa a erros, de um modo ainda mais preferido, limite de erro do PCR.

Os métodos preferidos de mutagénese de sequência de ADN que codifica uma enzima fitase progenitora é PCR propensa a erros, de um modo mais preferido, limite de erro do PCR, podem ser utilizados outros métodos de mutagénese em vez de PCR propensa a erros/limite de erro do PCR ou em conjunto com PCR propensa a erros/limite de erro do PCR. Ver Exemplo 12 que proporciona referências para métodos adequados de PCR propensa a erros e limite de erro do PCR. Outro método adequado para PCR mutagénico é divulgado por Cadwell e Joyce (*PCR Methods Appl.* 3(1994), 136-140)".

O termo "expressão numa célula hospedeira", quando utilizado no contexto das formas de realização a que se refere "um método de preparação de uma variante de enzima fitase" é, de um modo preferido, definido como produção da variante de enzima fitase num organismo, órgão ou célula viva, como aqui definido. Os hospedeiros preferidos são *Escherichia coli* K12; *Bacillus subtilis*; *Saccharomyces cerevisiae*. As enzimas fitase aqui pormenorizadas foram caracterizadas após expressão heteróloga em um ou mais dos seguintes hospedeiros de expressão: *Escherichia coli* K12; *Bacillus subtilis*; *Saccharomyces cerevisiae*.

No entanto, é considerado que, para a finalidade de selecção da variante de enzima fitase como aqui descrito, esses métodos podem empregar métodos de expressão *in vitro* de variantes de enzima fitase, de um modo preferido, para utilização na etapa (c) dos referidos métodos, que utilizam equipamentos de tradução e transcrição isolada a partir de uma ou mais células isoladas de um ou mais organismo ou vírus vivos. Tal produção *in vitro* de variantes fitase na descrição pode também ser utilizada para seleccionar as variantes fitase preferidas. A expressão *in vitro* pode ser, de um modo adequado, realizada utilizando técnicas padrão. Para referência ver, por favor, "In vitro Expression Guide" disponível de Promega Inc (Parte N° BR053).

Definições de Fenótipos de Variantes.

As variantes com maior estabilidade térmica (diferença de estabilidade térmica) são, de um modo preferido, determinadas utilizando os métodos divulgados no Exemplo 12.

A variante de enzima fitase preparada pelo método de preparação de variantes de enzima fitase, de um modo preferido, possui uma diferença de estabilidade térmica (T.D) de, pelo menos, 1,5, de um modo mais preferido, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, de um modo muito preferido, pelo menos 20.

As variantes com maior estabilidade proteolítica são, de um modo preferido, determinadas pelos métodos divulgados no Exemplo 12.

De um modo preferido, a variante de enzima codificada pela molécula de ácido nucleico isolada da invenção possui uma estabilidade proteolítica (actividade residual) de, pelo menos, 45%, de um modo preferido, 50%, 55%, de um modo mais preferido, pelo menos, 60% ou 65%, de um modo muito preferido, pelo menos, 70%.

De um modo preferido, a variante fitase codificada pela molécula de ácido nucleico isolada da invenção possui uma actividade específica de mais de 100% em peso de actividade a pH 4,0, de um modo preferido, mais de 105%, 110%, de um modo mais preferido, mais de 114%.

Outras Formas de Realização de Variantes - apenas para ilustração

Numa forma de realização adicional, são aqui descritos métodos para a preparação de uma ração animal compreendendo uma variante de enzima fitase, compreendendo o referido método as etapas sequenciais de i) realizar um ou mais dos métodos acima de preparação de uma variante de enzima fitase e ii) Adicionar a uma ração animal a variante da enzima fitase preparada.

Numa forma de realização específica, a descrição proporciona um método para a preparação de uma ração animal compreendendo uma variante de enzima fitase, compreendendo o referido método:

a) Seleccionar uma enzima fitase progenitora, em que a enzima fitase progenitora é seleccionada de

i. uma enzima fitase progenitora com, pelo menos, 75%

de homologia à SEQ ID N°: 3 ou seu fragmento funcional

- ii. uma enzima fitase progenitora derivada de *Buttiauxella spp.*, de um modo preferido, de *Buttiauxella* P1-29 e/ou
- iii. pelo menos, uma variante de enzima fitase;

b) Fazer, pelo menos, uma alteração que é uma inserção, uma remoção ou uma substituição de um resíduo de aminoácido na enzima fitase progenitora para obter uma variante de enzima fitase,

c) Rastrear uma variante de enzima fitase que comparada à enzima fitase progenitora possui características melhoradas, como aqui descritas, de um modo preferido, seleccionadas de um ou mais de:

- i. maior estabilidade térmica e/ou
- ii. actividade específica e/ou
- iii. estabilidade proteolítica e/ou

d) Preparar a variante de enzima fitase

e) Adicionar, à ração animal, a variante de enzima fitase preparada.

Numa forma de realização adicional, a descrição proporciona métodos para a preparação de uma ração animal compreendendo uma variante de enzima fitase.

a) Submeter uma sequência nucleotídica (de um modo preferido, ADN) que codifica uma enzima fitase progenitora a mutagénesis, em que o referido nucleótido é seleccionado

de um nucleótido que codifica

- i. uma enzima fitase progenitora com, pelo menos, 75% de homologia à SEQ ID N°: 3 ou seu fragmento funcional, e/ou
- ii. uma enzima fitase progenitora derivada de *Buttiauxella spp.*, de um modo preferido, *Buttiauxella* P1-29

b) Expressar a sequência nucleotídica mutada (de um modo preferido, ADN) obtida na etapa (a) numa célula hospedeira e

c) Rastrear as células hospedeiras que expressam para uma variante de enzima fitase, que comparada à enzima fitase progenitora, possui características melhoradas, como aqui descritas, de um modo preferido, seleccionadas de um ou mais de:

- i. maior estabilidade térmica e/ou
- ii. maior actividade específica e/ou
- iii. maior estabilidade proteolítica e/ou

d) Preparar a variante de enzima fitase expressa pela célula hospedeira

f) Adicionar, à ração animal, a variante de enzima fitase preparada

As formas de realização descritas e aspectos preferidos do método de preparação de uma variante de enzima fitase também se aplicam aos métodos acima de preparação de uma ração animal

compreendendo uma variante de enzima fitase.

Formas de Realização Muito Preferidas

Numa forma de realização muito preferida, a presente invenção refere-se a uma molécula de ácido nucleico isolada, métodos de produção de um polipéptido utilizando a referida molécula de ácido nucleico e uma célula hospedeira, plasmídeo ou sistema de vectores, de acordo com os seguintes parágrafos numerados:

1. Molécula de ácido nucleico isolada seleccionada de:

i) uma molécula de ácido nucleico isolada que codifica um polipéptido seleccionado do grupo consistindo de:

- um polipéptido compreendendo a sequência de aminoácidos como apresentada em SEQ ID N°: 3 ou uma sequência de aminoácidos possuindo, pelo menos, 80% de identidade a esta;
- um polipéptido obtido da estirpe *Buttiauxella* sp. P1-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248;
- um polipéptido obtido pela expressão de SEQ ID N°: 2 ou uma sequência nucleotídica obtida da estirpe *Buttiauxella* sp. P1-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248 ou uma sequência nucleotídica possuindo, pelo menos, 80% de identidade a esta sequência; e
- um polipéptido obtido da estirpe *Buttiauxella* sp. P1-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248 e

em que o péptido é obtido pela expressão de SEQ ID N°: 2 ou uma sequência nucleotídica obtida da estirpe *Buttiauxella* sp. P1-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248 ou uma sequência nucleotídica, possuindo, pelo menos, 80% de identidade a esta sequência,

em que o referido polipéptido possui actividade de fitase, em que o referido polipéptido possui uma actividade específica de, pelo menos, 300 U/mg, em que a referida actividade específica é determinada por incubação do referido polipéptido numa solução contendo fitato 2 mM, CaCl_2 0,8 mM em 200 mM de tampão de acetato de sódio a pH 3,5, a uma temperatura de 37 °C.

ii) uma molécula de ácido nucleico isolada compreendendo a sequência como apresentada em SEQ ID N°: 2;

iii) um ácido nucleico que hibrida a SEQ ID N°: 2 sob condições restritivas a 50 °C e 0,2 X SSC.

2. Uma molécula de ácido nucleico isolada de acordo com o parágrafo 1 que codifica um polipéptido seleccionado do grupo consistindo de:

- um polipéptido compreendendo a sequência de aminoácidos como apresentada em SEQ ID N°: 3 ou uma sequência de aminoácidos possuindo, pelo menos, 80% de identidade a esta;
- um polipéptido obtido da estirpe *Buttiauxella* sp. P1-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248;

- um polipéptido obtido pela expressão de SEQ ID N°: 2 ou uma sequência nucleotídica obtida da estirpe *Buttiauxella* sp. P1-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248 ou uma sequência nucleotídica possuindo, pelo menos, 80% de identidade a esta sequência; e
- um polipéptido obtido da estirpe *Buttiauxella* sp. P1-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248 e em que o péptido é obtido pela expressão de SEQ ID N°: 2 ou uma sequência nucleotídica obtida da estirpe *Buttiauxella* sp. P1-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248 ou uma sequência nucleotídica, possuindo, pelo menos, 80% de identidade a esta sequência,

em que o referido polipéptido possui actividade de fitase, em que o referido polipéptido possui uma actividade específica de, pelo menos, 300 U/mg, em que a referida actividade específica é determinada por incubação do referido polipéptido numa solução contendo fitato 2 mM, CaCl_2 0,8 mM em 200 mM de tampão de acetato de sódio a pH 3,5, a uma temperatura de 37 °C.

3. Uma molécula de ácido nucleico isolada de acordo com o parágrafo 1 ou parágrafo 2 compreendendo uma sequência nucleotídica que é a mesma, ou complementar a SEQ ID N°: 2, ou compreende uma sequência que possui, pelo menos, 80% de identidade de sequência com SEQ ID N°: 2.
4. Uma molécula de ácido nucleico isolada de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 3, em que a referida

molécula de ácido nucleico codifica um polipéptido possuindo um máximo de actividade a, aproximadamente, pH 3 a 6, em que a referida actividade é determinada por incubação do referido polipéptido numa solução contendo fitato 2 mM, CaCl_2 0,8 mM em tampão de acetato de sódio 200 mM a uma temperatura de 37 °C.

5. Uma molécula de ácido nucleico isolada de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 3, em que a referida molécula de ácido nucleico codifica um polipéptido possuindo um máximo de actividade a, aproximadamente, pH 4 a 5, em que a referida actividade é determinada por incubação do referido polipéptido numa solução contendo fitato 2 mM, CaCl_2 0,8 mM em tampão de acetato de sódio 200 mM a uma temperatura de 37 °C.
6. Uma molécula de ácido nucleico isolada de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 3, em que a referida molécula de ácido nucleico codifica um polipéptido possuindo um máximo de actividade a, aproximadamente, pH 4,5, em que a referida actividade é determinada por incubação do referido polipéptido numa solução contendo fitato 2 mM, CaCl_2 0,8 mM em tampão de acetato de sódio 200 mM a uma temperatura de 37 °C.
7. Uma molécula de ácido nucleico isolada de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 6, em que a referida molécula de ácido nucleico codifica um polipéptido compreendendo mutações em, pelo menos, uma das seguintes posições, numeradas de acordo com a numeração em SEQ ID N°: 3: K 59, T 70, A 122, D 125, T 167, H 193, F 197, T 204, T 209, A 211, S 221, I 223, S 225, K 240,

A 242, D 244, A 268, S 281, Q 289, A 294, N 303, I 336 ou N 351.

8. Uma molécula de ácido nucleico isolada de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 7, em que a referida molécula de ácido nucleico codifica um polipéptido compreendendo uma ou mais das seguintes mutações:

K 59 A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W ou Y;

ou

T 70 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W ou Y;

ou

A 122 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W ou Y;

ou

D 125 A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W ou Y;

ou

T 167 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W ou Y;

ou

H 193 A, C, D, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W ou Y;

ou

F 197 A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W ou Y;

ou

T 204 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W ou Y;

ou

T 209 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W
ou Y;

ou

A 211 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W
ou Y;

ou

S 221 A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W
ou Y;

ou

D 223 A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W
ou Y;

ou

G 225 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W
ou Y;

ou

K 240 A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W
ou Y;

ou

A 242 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W
ou Y;

ou

D 244 A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W
ou Y;

ou

A 268 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W
ou Y;

ou

S 281 A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W
ou Y;

ou

Q 289 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W
ou Y;

ou

A 294 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W
ou Y;

ou

N 303 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W
ou Y;

ou

I 336 A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W
ou Y;

ou

N 351 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W
ou Y.

9. Uma molécula de ácido nucleico isolada de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 8, em que a referida molécula de ácido nucleico codifica um polipéptido compreendendo, pelo menos, uma mutação seleccionada do grupo consistindo de: K59E; T167V; K240T; T167I; K240E; D244C; Q289Y; T209K ou F197S.

10. Uma molécula de ácido nucleico isolada de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 9, em que a referida molécula de ácido nucleico codifica um polipéptido compreendendo uma combinação de mutações seleccionadas do grupo consistindo de:

D125E/H193R; ou

A294E/N303K; ou

T167I/K240T; ou

D223E/K240E/N351D; ou

T167I/K240T/A294E/N303K; ou

T167I/K240E/A242S/A294E/N303K; ou

A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A294E/N303K; ou
A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A242S/S281L/Q289Y/
A294E/N303K; ou
A122T/D125E/H193R/F197S/T209K/A211P/S221N/G225A/K240E/
A294E/N303K; ou
D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/
Q289H/A294E/N303K; ou
A122T/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/
Q289H/A294E/N303K/I336F; ou
N70Y/D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/
A268V/Q289H/A294E/N303K.

11. Uma molécula de ácido nucleico isolada de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 10, em que a referida molécula de ácido nucleico codifica um polipéptido compreendendo a combinação de mutações:

A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A242S/S281L/Q289Y/A294E/
N303K.

12. Uma molécula de ácido nucleico isolada de acordo com qualquer um dos parágrafos 7 a 10, em que a referida molécula de ácido nucleico codifica um polipéptido que é uma variante de enzima fitase que possui maior estabilidade térmica e/ou maior actividade específica e/ou maior estabilidade proteolítica comparada à enzima fitase codificada por SEQ ID N°: 2.

13. Um plasmídeo ou sistema de vectores compreendendo uma molécula de ácido nucleico de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 12.

14. Um plasmídeo ou sistema de vectores de acordo com o parágrafo 13, em que o referido plasmídeo ou sistema de vectores é um vector de expressão para expressão de qualquer dos polipéptidos como definido em qualquer um dos parágrafos 1 a 12 e/ou compreende polinucleótidos de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 12 num microrganismo.
15. Uma célula hospedeira transformada ou transfectada com um plasmídeo ou sistema de vectores como descrito em qualquer dos parágrafos 13 ou 14.
16. Uma célula hospedeira como descrita no parágrafo 15 que expressa um polipéptido como definido em qualquer um dos parágrafos 1 a 12.
17. Uma célula hospedeira como descrita no parágrafo 15 ou 16, em que a referida célula hospedeira é derivada de um microrganismo.
18. Uma célula hospedeira como descrita em qualquer um dos parágrafos 15 a 17, em que a referida célula hospedeira é seleccionada de bactérias ou fungos.
19. Uma célula hospedeira como descrita em qualquer um dos parágrafos 15 a 18, em que a referida célula hospedeira é seleccionada de bactérias, leveduras e fungos filamentosos.
20. Uma célula hospedeira como descrita em qualquer um dos parágrafos 15 a 19, em que a referida célula hospedeira é seleccionada de *B. subtilis*, *E. coli*, *H. polymorpha*, *S. pombe*, *S. cerevisiae*, *Trichoderma spp.* e *Aspergillus spp.*
21. Uma célula hospedeira como descrita no parágrafo 20, em que

a referida *Aspergillus spp.* é *A. oryzae*.

22. Uma célula hospedeira como descrita em qualquer um dos parágrafos 15 a 20, em que a referida célula hospedeira é uma célula bacteriana procariótica, de um modo preferido, *E. coli*.
23. Uma célula hospedeira como descrita no parágrafo 22, em que a referida célula hospedeira é *E. coli*.
24. Uma célula bacteriana de estirpe *Buttiauxella sp.* P1-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248.
25. Um método de produção de um polipéptido compreendendo transformar uma célula hospedeira com um polinucleótido de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 12, em que o referido polipéptido é seleccionado do grupo consistindo de:
 - um polipéptido compreendendo a sequência de aminoácidos como apresentada em SEQ ID N°: 3 ou uma sequência de aminoácidos possuindo, pelo menos, 80% de identidade a esta;
 - um polipéptido obtido da estirpe *Buttiauxella sp.* P1-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248;
 - um polipéptido obtido pela expressão de SEQ ID N°: 2 ou uma sequência nucleotídica obtida da estirpe *Buttiauxella sp.* P1-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248 ou uma sequência nucleotídica possuindo, pelo menos, 80% de identidade a esta sequência; e
 - um polipéptido obtido da estirpe *Buttiauxella sp.* P1-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248 e

em que o péptido é obtido pela expressão de SEQ ID N°: 2 ou uma sequência nucleotídica obtida da estirpe *Buttiauxella* sp. P1-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248 ou uma sequência nucleotídica, possuindo, pelo menos, 80% de identidade a esta sequência,

em que o referido polipéptido possui actividade de fitase, em que o referido polipéptido possui uma actividade específica de, pelo menos, 300 U/mg, em que a referida actividade específica é determinada por incubação do referido polipéptido numa solução contendo fitato 2 mM, CaCl_2 0,8 mM em 200 mM de tampão de acetato de sódio a pH 3,5, a uma temperatura de 37 °C.

26. Um método de produção de um polipéptido de acordo com o parágrafo 25 compreendendo transformar uma célula hospedeira com um polinucleótido de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 12 com um plasmídeo ou vector de acordo com qualquer um dos parágrafos 13 ou 14.
27. Um método de produção de um polipéptido de acordo com o parágrafo 25 ou parágrafo 26, em que a referida célula hospedeira é uma célula hospedeira como definida em qualquer um dos parágrafos 1 a 24.
28. Um método de produção de um polipéptido compreendendo expressar um polinucleótido de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 12, em que o referido polipéptido é seleccionado do grupo consistindo de:

- um polipéptido compreendendo a sequência de

aminoácidos como apresentada em SEQ ID N°: 3 ou uma sequência de aminoácidos possuindo, pelo menos, 80% de identidade a esta;

- um polipéptido obtido da estirpe *Buttiauxella sp.* P1-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248;
- um polipéptido obtido pela expressão de SEQ ID N°: 2 ou uma sequência nucleotídica obtida da estirpe *Buttiauxella sp.* P1-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248 ou uma sequência nucleotídica possuindo, pelo menos, 80% de identidade a esta sequência; e
- um polipéptido obtido da estirpe *Buttiauxella sp.* P1-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248 e em que o péptido é obtido pela expressão de SEQ ID N°: 2 ou uma sequência nucleotídica obtida da estirpe *Buttiauxella sp.* P1-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248 ou uma sequência nucleotídica, possuindo, pelo menos, 80% de identidade a esta sequência,

em que o referido polipéptido possui actividade de fitase, em que o referido polipéptido possui uma actividade específica de, pelo menos, 300 U/mg, em que a referida actividade específica é determinada por incubação do referido polipéptido numa solução contendo fitato 2 mM, CaCl_2 0,8 mM em 200 mM de tampão de acetato de sódio a pH 3,5, a uma temperatura de 37 °C.

29. Um método de produção de um polipéptido de acordo com o parágrafo 28 compreendendo expressar um polinucleótido, de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 12, num plasmídeo

ou vector de acordo com qualquer um dos parágrafos 13 ou 14.

30. Um método de produção de um polipéptido compreendendo expressar um polinucleótido de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 12 numa célula hospedeira num meio de cultura e separar o referido polipéptido do meio de cultura da célula hospedeira, em que o referido polipéptido é seleccionado do grupo consistindo de:

- um polipéptido compreendendo a sequência de aminoácidos como apresentada em SEQ ID N°: 3 ou uma sequência de aminoácidos possuindo, pelo menos, 80% de identidade a esta;
- um polipéptido obtido da estirpe *Buttiauxella* sp. P1-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248;
- um polipéptido obtido pela expressão de SEQ ID N°: 2 ou uma sequência nucleotídica obtida da estirpe *Buttiauxella* sp. P1-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248 ou uma sequência nucleotídica possuindo, pelo menos, 80% de identidade a esta sequência; e
- um polipéptido obtido da estirpe *Buttiauxella* sp. P1-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248 e em que o péptido é obtido pela expressão de SEQ ID N°: 2 ou uma sequência nucleotídica obtida da estirpe *Buttiauxella* sp. P1-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248 ou uma sequência nucleotídica, possuindo, pelo menos, 80% de identidade a esta sequência,

em que o referido polipéptido possui actividade de fitase, em que o referido polipéptido possui uma actividade específica de, pelo menos, 300 U/mg, em que a referida actividade específica é determinada por incubação do referido polipéptido numa solução contendo fitato 2 mM, CaCl_2 0,8 mM em 200 mM de tampão de acetato de sódio a pH 3,5, a uma temperatura de 37 °C.

31. Um método de produção de um polipéptido de acordo com o parágrafo 30 compreendendo expressar um polinucleótido, de acordo com qualquer um dos parágrafos 1 a 12, num plasmídeo ou vector de acordo com qualquer um dos parágrafos 13 ou 14 numa célula hospedeira.

Noutro aspecto da invenção, é proporcionada uma célula hospedeira transformada ou transfectada com um ácido nucleico que codifica uma fitase como aqui descrita.

De um modo adequado, a célula hospedeira, de acordo com este aspecto da invenção, compreende uma fitase que compreende uma sequência de aminoácidos, como exposto em SEQ ID N°: 3 ou uma sequência que é, pelo menos, 80% homóloga a essa.

Numa forma de realização preferida, a referida célula hospedeira produz uma fitase.

Num aspecto adicional da invenção, é proporcionada uma célula hospedeira transformada ou transfectada com um ácido nucleico que codifica uma fitase, de acordo com a invenção. De um modo preferido, a fitase é uma fitase *Buttiauxella sp.* como aqui descrita ou um homólogo ou seu derivado. De um modo adequado, a referida enzima fitase compreende uma sequência de aminoácidos, como exposto em qualquer de SEQ ID N°: 3 ou uma

sequência que é, pelo menos, 80% homóloga (idêntica) a essa. De um modo preferido, a referida célula hospedeira produz uma fitase.

Numa forma de realização, a sequência nucleotídica que pode ser utilizada na presente invenção é obtida a partir de (embora não tenha de ser realmente obtida de) *Buttiauxella* sp., embora seja reconhecido que as enzimas isoladas e/ou purificadas de estirpes equivalentes podem ser igualmente utilizadas.

De um modo adequado, a célula hospedeira é derivada de um microrganismo incluindo bactérias e fungos, incluindo levedura. Numa forma de realização particularmente preferida, a célula hospedeira é uma célula bacteriana procariótica. As células hospedeiras bacterianas adequadas incluem bactérias de diferentes grupos taxonômicos procarióticos, incluindo proteobactérias, incluindo membros da subdivisão alfa, beta, gama, delta e epsilon, bactérias gram-positivas, tais como *Actinomicetes*, *Firmicutes*, *Clostridium* e relativas, flavobactérias, cianobactérias, bactérias sulfurosas verdes, bactérias não-sulfurosas verdes e *archaea*. As particularmente preferidas são as *Enterobacteriaceae*, tais como proteobactérias *Escherichia coli* pertencentes à subdivisão gama e bactérias baixas de GC-Gram positivas, tal como *Bacillus*.

As células hospedeiras de fungos adequadas incluem leveduras seleccionadas do grupo consistindo de *Ascomycota*, incluindo *Saccharomycetes*, tais como *Pichia*, *Hansenula* e *Saccharomyces*, *Schizosaccharomycetes*, tais como *Schizosaccharomyces pombe* e *Ascomycota* anamórfica incluindo *Aspergillus*.

Outras células hospedeiras eucarióticas adequadas incluem

células de insectos, tais como células SF9, SF21, *Trychoplusiani* e M121. Por exemplo, os polipéptidos, de acordo com a invenção, podem, de um modo vantajoso, ser expressos em sistemas de células de insectos. Bem como a expressão em células de insectos em culturas, os genes fitase podem ser expressos em todos os organismos de insectos. Os vectores de vírus, tal como bacilovirus, permitem a infecção de insectos inteiros. Grandes insectos, tal como bichos-da-seda, proporcionam um elevado rendimento de proteína heteróloga. A proteína pode ser extraída dos insectos de acordo com as técnicas de extracção convencionais. Os vectores de expressão adequados para utilização na descrição incluem todos os vectores que são capazes de expressar proteínas estranhas em linhas celulares de insectos.

Outras células hospedeiras incluem células de plantas seleccionadas do grupo consistindo de protoplastos, células, calli, tecidos, órgãos, sementes, embriões, óvulos, zigotos, etc. A invenção também proporciona plantas inteiras que foram transformadas e compreendem o ADN recombinante da invenção.

O termo "planta", geralmente, inclui algas eucarióticas, embriófitos incluindo Briófitas, Pteridófitas e Espermatófitas, tais como Gimnospérmicas e Angiospérmicas.

De um modo preferido, a referida célula hospedeira é um microrganismo. Os microrganismos preferidos incluem células bacterianas procarióticas, de um modo preferido, *E. coli*, *B. subtilis* e outras espécies do género *Bacillus*, leveduras, de um modo preferido, *Hansenula polymorfa* e *Schizosaccharomyces pombe*.

Noutro aspecto da invenção, é proporcionada uma estirpe de célula bacteriana de *Buttiauxella* sp P1-29 depositada por Danisco Global Innovation, Sokeritehtaantie 20, FIN-02460 Kantvik, Finlândia, em 22 de Setembro de 2004, sob o número de acesso NCIMB 41248. Essa célula pode ser incorporada directamente para uma ração.

Noutro aspecto, é proporcionado um método para a produção de fitases compreendendo transfectar uma célula hospedeira com um vector de expressão ou plasmídeo, de acordo com a invenção, cultivar a referida célula hospedeira sob condições para a expressão da fitase e extrair a referida fitase a partir do meio de cultura da célula hospedeira.

De um modo adequado, o referido método é para a produção de uma fitase compreendendo expressar uma sequência de aminoácidos como exposto em SEQ ID N°: 3 ou uma sequência possuindo, pelo menos, 80% de homologia a essa numa célula hospedeira e extrair a proteína secretada a partir do meio de cultura da célula hospedeira.

Alimento ou ração - apenas para ilustração

Outro aspecto da descrição proporciona uma composição de ração compreendendo uma fitase, de acordo com a invenção. De um modo preferido, a composição de ração compreende uma fitase a uma concentração de 10-10000 U/kg de ração, de um modo preferido, 200-2000 U/kg de ração, de um modo mais preferido, 500-1000 U/kg de ração.

Numa forma de realização, a composição de ração compreende

uma célula hospedeira de acordo com a descrição.

Num aspecto adicional, é proporcionada a utilização de uma fitase, de acordo com a invenção, num alimento ou ração animal.

ASPECTOS PREFERIDOS

Os aspectos preferidos são apresentados nas reivindicações anexas e na seguinte descrição e secção de Exemplos.

VANTAGENS ADICIONAIS

A presente invenção é vantajosa uma vez que proporciona moléculas de ácido nucleico isoladas que codificam para fitases que possuem uma variedade de propriedades que as tornam particularmente úteis como aditivos para rações animais.

Em particular, as fitases codificadas pelas moléculas de ácido nucleico isoladas da presente invenção são activas a pH baixo e, de um modo preferido, na gama de pH 2 a 5,5 com máximo de actividade a, aproximadamente, pH 4-4,5. De um modo adequado, as fitases são activas a pH baixo (permanecendo cerca de 40% da actividade máxima a pH 2,5) do ambiente do estômago.

Além disso, as fitases codificadas pelas moléculas de ácido nucleico isoladas da presente invenção são eficientemente secretadas no hospedeiro nativo e durante a expressão heteróloga levando, deste modo, a uma produção e isolamento eficazes para adição a alimentos.

Além disso, as fitases codificadas pelas moléculas de ácido nucleico isoladas da presente invenção, de um modo preferido, possuem uma vasta especificidade de substrato incluindo substratos de penta- tetra, tri e di- fosfato aumentando assim o fosfato total disponível para absorção pelo animal (fosfato disponível). As fitases também possuem, de um modo preferido, uma actividade específica elevada na região de 300 U/mg +/-, aproximadamente, 10%, de um modo preferido, pelo menos 300 U/mg.

Os produtos da presente invenção podem ser utilizados como aditivos/suplementos para alimentos e rações. Os produtos podem também ser úteis na produção comercial de vários fosfatos de inositol.

FITATO/ÁCIDO FÍTICO/FITASES

O ácido fítico (*mio*-inositol hexaquisfosfato) é um constituinte importante em cereais, legumes e culturas de oleaginosas. A forma de sal, fitato, é a maior forma de armazenamento de fósforo nestas plantas.

As fitases catalisam a hidrólise de monoésteres de fosfato de ácido fítico que resulta na formação de etapa contrária de *mio*-inositol pentaquis-, tetraquis-, tris-, bis- e monofosfatos, bem como a libertação de fosfato inorgânico.

Os termos “fitase tipo selvagem” ou “tipo selvagem”, como aqui utilizado, refere-se a uma enzima fitase com uma sequência de aminoácidos encontrada na natureza.

Os termos “variante fitase” ou “variante” ou “forma

modificada" referem-se a uma enzima fitase com uma sequência de aminoácidos derivada da sequência de aminoácidos de uma fitase progenitora possuindo uma ou mais substituições, inserções e/ou deleções de aminoácidos que em conjunto são referidos como "mutações".

Os termos "fitase progenitora" ou "enzima progenitora" referem-se a uma enzima fitase a partir da qual é derivada uma variante fitase. Uma fitase progenitora pode ser uma fitase tipo selvagem ou outra variante fitase. Em particular, na presente invenção, uma "fitase progenitora" pode ser derivada de uma *Buttiauxella* sp. De um modo adequado, a "fitase progenitora" é derivada de estirpe de *Buttiauxella* P1-29 como aqui descrita que, de um modo preferido, possui a sequência de aminoácidos exposta em SEQ ID N°: 3.

ISOLADA

Num aspecto, de um modo preferido, a sequência de nucleótidos ou aminoácidos está numa forma isolada. O termo "isolada" significa que a sequência é, pelo menos, substancialmente livre de, pelo menos, um outro componente com o qual a sequência está naturalmente associada na natureza e como encontrada na natureza.

PURIFICADA

Num aspecto, de um modo preferido, a sequência de nucleótidos ou aminoácidos está numa forma purificada. O termo "purificada" significa que uma sequência está num estado

relativamente puro, pelo menos, 1%, 5% puro ou 10% puro, de um modo mais preferido, pelo menos, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% puro. Numa forma de realização preferida, quando se refere a um polipéptido, a pureza como acima definida é determinada em termos de ser purificada a partir de outros polipéptidos por electroforese SDS-PAGE. Numa forma de realização preferida, quando se refere a um polinucleótido, a pureza como acima definida é determinada em termos de ser purificada a partir de outros polinucleótidos.

SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA

O âmbito da presente invenção inclui sequências nucleotídicas que codificam enzimas possuindo as propriedades específicas como aqui definidas.

O termo “sequência nucleotídica”, como aqui utilizado, refere-se a uma sequência oligonucleotídica, ácido nucleico ou sequência polinucleotídica e variante, homólogos, fragmentos e seus derivados (tais como suas porções). A sequência nucleotídica pode ser de origem genómica ou sintética ou recombinante, que pode ser cadeia dupla ou cadeia simples representando a cadeia sentido ou anti-sentido.

O termo “sequência nucleotídica” ou “molécula de ácido nucleico”, em relação à presente invenção, inclui ADN genómico, ADNc, ADN sintético e ARN. De um modo preferido, significa ADN, de um modo mais preferido, sequência de ADNc que codifica para a presente invenção.

Numa forma de realização preferida, a sequência nucleotídica

quando relacionada com e quando incluída *per se* pelo âmbito da presente invenção não inclui a sequência nucleotídica nativa, de acordo com a presente invenção, quando no seu ambiente natural e quando está ligada à sua(s) sequência(s) naturalmente associada(s) que está/estão também no(s) seu/seus ambiente(s) natural(ais). Para facilidade de referência, deve designar-se esta forma de realização preferida a “sequência nucleotídica não nativa”. Quanto a isto, o termo “sequência nucleotídica nativa” significa uma sequência nucleotídica inteira que está no seu ambiente nativo e quando operacionalmente ligada a um promotor inteiro com que está naturalmente associada, esse promotor está também no seu ambiente nativo. No entanto, a sequência de aminoácidos incluída pelo âmbito da presente invenção pode ser isolada e/ou purificada pós expressão de uma sequência nucleotídica no seu organismo nativo. De um modo preferido, no entanto, uma sequência de aminoácidos incluída pelo âmbito da presente invenção pode ser expressa por uma sequência nucleotídica no seu organismo nativo, mas em que a sequência nucleotídica não está sob o controlo do promotor que está naturalmente associado dentro desse organismo.

PREPARAÇÃO DE UMA SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA

Tipicamente, a sequência nucleotídicas incluídas pelo âmbito da presente invenção ou as sequências nucleotídicas para utilização na presente invenção são preparadas utilizando técnicas de ADN recombinante (*i. e.*, ADN recombinante). No entanto, numa forma de realização alternativa da invenção, a sequência nucleotídica podia ser sintetizada, num todo ou em parte, utilizando métodos químicos bem conhecidos na técnica (ver Caruthers MH *et al.*, (1980) *Nuc Acids Res Symp Ser* 215-23 e

Horn T et al., (1980) *Nuc Acids Res Symp Ser* 225-232).

Uma sequência nucleotídica que codifica uma enzima que possui propriedades específicas, como aqui definidas, ou uma enzima que é adequada para modificação pode ser identificada e/ou isolada e/ou purificada a partir de qualquer célula ou organismo produzindo a referida enzima. São conhecidos dentro da técnica vários métodos para a identificação e/ou isolamento e/ou purificação de sequências nucleotídicas. A título de exemplo, podem ser utilizadas técnicas de amplificação de PCR para preparar mais de uma sequência, uma vez que foi identificada e/ou isolada e/ou purificada uma sequência adequada.

A título de outro exemplo, uma biblioteca de ADN genómico e/ou ADNc pode ser construída utilizando ADN cromossómico ou ARN mensageiro a partir do organismo que produz a enzima. Se a sequência de aminoácidos da enzima ou uma parte da sequência de aminoácidos da enzima é conhecida, sondas oligonucleótídicas marcadas podem ser sintetizadas e utilizadas para identificar clones que codificam a enzima a partir da biblioteca genómica preparada a partir do organismo. De um modo alternativo, uma sonda oligonucleótídica marcada contendo sequências homólogas a um outro gene de enzima conhecido podia ser utilizado para identificar os clones que codificam a enzima. No último caso, são utilizadas condições de hibridação e lavagem de baixa restringência.

De um modo alternativo, os clones que codificam a enzima podiam ser identificados por inserção de fragmentos de ADN genómico num vector de expressão, tal como um plasmídeo, transformando a enzima de bactéria negativa com a biblioteca de ADN genómico resultante e colocando, então, em placas a bactéria

transformada para placas de ágar contendo um substrato para a enzima (e. g., maltose para uma glucosidase (maltase) produzindo enzima), permitindo assim aos clones expressar a enzima a ser identificada.

Ainda numa outra alternativa, a sequência nucleotídica que codifica a enzima pode ser preparada sinteticamente por métodos padrão estabelecidos, e. g., o método de fosforoamidite descrito por Beucage S.L. et al., (1981) *Tetrahedron Letters* 22, p. 1859-1869, ou o método descrito por Matthes et al., (1984) *EMBO J.* 3, p. 801-805. No método de fosforoamidite, os oligonucleótidos são sintetizados, e. g., num sintetizador automático de ADN, purificados, emparelhados, ligados e clonados em vectores apropriados.

A sequência nucleotídica pode ser de origem genómica mista e sintética, origem sintética mista e ADNc, ou origem genómica mista e ADNc, preparada ligando fragmentos de origem sintética, genómica ou ADNc (como apropriado) de acordo com técnicas padrão. Cada fragmento ligado corresponde a várias partes da sequência nucleotídica inteira. A sequência de ADN pode também ser preparada por reacção de polimerização em cadeia (PCR) utilizando iniciadores específicos, por exemplo, como descrito no documento US 4683202 ou em Saiki R K et al., (Science (1988) 239, p. 487-491).

Devido à degenerescência no código genético, as sequências nucleotídicas podem ser rapidamente produzidas em que a utilização do codão triplete, para alguns ou para todos os aminoácidos codificados pela sequência nucleotídica original, foram assim alterados produzindo uma sequência nucleotídica com baixa homologia à sequência nucleotídica original mas que

codifica a mesma, ou uma variante, sequência de aminoácidos como codificada pela sequência nucleotídica original. Por exemplo, para a maioria dos aminoácidos a degenerescência do código genético é na terceira posição no codão triplete (posição oscilante) (para referência ver Stryer, Lubert, *Biochemistry*, Terceira Edição, Freeman Press, ISBN 0-7167-1920-7), portanto, uma sequência nucleotídica em que todos os codões tripletos foram “oscilados” na terceira posição seria cerca de 66% idêntica à sequência nucleotídica original, no entanto, a sequência nucleotídica emendada poderia codificar para a mesma ou uma variante, sequência de aminoácidos primária como a sequência nucleotídica original.

Portanto, a presente invenção refere-se ainda a qualquer sequência nucleotídica que possui a utilização de um codão de triplete alternativo para, pelo menos, um aminoácido que codifica codão triplete, mas que codifica o mesmo ou uma variante, sequência de polipéptido como a sequência de polipéptido codificada pela sequência nucleotídica original.

Além disso, os organismos específicos, tipicamente, possuem um enviesamento ao qual os codões de triplete são utilizados para codificar aminoácidos. As tabelas de utilização de codões preferidos estão vastamente disponíveis e podem ser utilizadas para preparar codões de genes otimizados. Essas técnicas de otimização de codões são habitualmente utilizadas para otimizar a expressão de transgenes num hospedeiro heterólogo.

EVOLUÇÃO MOLECULAR

Uma vez que uma sequência nucleotídica que codifica enzima

foi isolada e/ou purificada, ou uma sequência nucleotídica que codifica uma enzima putativa foi identificada, pode ser desejável modificar a sequência nucleotídica seleccionada, por exemplo, pode ser desejável mudar a sequência de modo a preparar uma enzima de acordo com a presente invenção.

As mutações podem ser introduzidas utilizando oligonucleótidos sintéticos. Estes oligonucleótidos contêm sequências nucleotídicas flanqueando os locais de mutação pretendidos.

Um método adequado é divulgado em Morinaga *et al.*, (*Biotechnology* (1984) 2, p. 646-649). Outro método de introdução de mutações em sequências nucleotídicas que codificam enzima é descrito em Nelson e Long (*Analytical Biochemistry* (1989), 180, p. 147-151).

Em vez de mutagénese dirigida ao local, tal como descrito acima, podem ser introduzidas mutações aleatoriamente, por exemplo, utilizando um kit comercial, tal como o kit de mutagénese GeneMorf PCR de Stratagene ou o kit de mutagénese aleatória Diversify PCR de Clontech.

Um terceiro método para obter novas sequências é fragmentar sequências nucleotídicas não idênticas, utilizando qualquer número de enzimas de restrição ou uma enzima, tal como DNase I, e remontando sequências nucleotídicas completas que codificam para proteínas funcionais. De um modo alternativo, qualquer um pode utilizar uma ou mais sequências nucleotídicas não idênticas e introduzir mutações durante a remontagem da sequência nucleotídica completa.

Deste modo, é possível produzir numerosas mutações dirigidas ao local ou aleatórias numa sequência nucleotídica, ou *in vivo* ou *in vitro* e, subsequentemente, rastrear para funcionalidade melhorada do polipéptido codificado por vários meios.

Como um exemplo não limitante, as mutações ou variantes naturais de uma sequência polinucleotídica podem ser recombinadas com o tipo selvagem ou outras mutações ou variantes naturais para produzir novas variantes. Essas novas variantes podem também ser rastreadas para funcionalidade melhorada do polipéptido codificado. A produção de novas variantes preferidas pode ser conseguida por vários métodos expostos na técnica, por exemplo, o *Error Threshold Mutagenesis* (documento WO 92/18645), mutagénese aleatória de oligonucleótido mediado (documento US 5723323), inversão de ADN (documento US 5605793), montagem génica exo-mediada (documento WO 0058517). Outros métodos adequados são descritos, por exemplo, nos documentos WO 0134835, WO 02/097130, WO 03/012100, WO03/057247, WO 2004/018674, US 6303344 e US 6132970.

A aplicação dos métodos de evolução molecular acima mencionados e semelhantes permite a identificação e selecção de variantes das enzimas codificadas pelas moléculas de ácido nucleico isoladas da presente invenção que possuem características preferidas sem qualquer conhecimento anterior da estrutura ou função da proteína e permite a produção de mutações ou variantes não-previsíveis mas benéficas. Existem numerosos exemplos da aplicação da evolução molecular na técnica para a optimização ou alteração de actividade enzimática, esses exemplos incluem, mas não são limitados a um ou mais dos seguintes: expressão e/ou actividade optimizada numa célula

hospedeira ou *in vitro*, actividade enzimática aumentada, substrato alterado e/ou especificidade de produto, estabilidade enzimática ou estrutural aumentada ou diminuída, actividade/especificidade enzimática alterada em condições ambientais preferidas, e. g., temperatura, pH, substrato.

Os métodos de evolução molecular acima podem ser utilizados nos métodos de preparação de uma variante de enzima fitase como aqui descrito.

SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS

O âmbito da presente invenção também inclui moléculas de ácido nucleico isoladas que codificam sequências de aminoácidos de enzimas possuindo propriedades específicas como aqui definidas.

Como aqui utilizado, o termo "sequência de aminoácidos" é sinónimo com o termo "polipéptido" e/ou o termo "proteína". Em alguns exemplos, o termo "sequência de aminoácidos" é sinónimo com o termo "péptido". Em alguns exemplos, o termo "sequência de aminoácidos" é sinónimo com o termo "enzima".

A sequência de aminoácidos pode ser preparada/isolada a partir de uma fonte adequada ou pode ser feita sinteticamente ou pode ser preparada pela utilização de técnicas de ADN recombinante.

A enzima codificada pelas moléculas de ácido nucleico isoladas incluídas na presente invenção pode ser utilizada em conjunto com outras enzimas. Deste modo, a presente descrição

também cobre uma combinação de enzimas, em que a combinação compreende a enzima codificada pelas moléculas de ácido nucleico isoladas da presente invenção e outra enzima, que pode ser outra enzima de acordo com a presente invenção. Este aspecto é discutido numa secção posterior.

De um modo preferido, a sequência de aminoácidos quando relacionada a e quando incluída *per se* no âmbito da presente invenção não é uma enzima nativa. Quanto a isto, o termo “enzima nativa” significa uma enzima inteira que está no seu ambiente nativo e quando foi expressa pela sua sequência nucleotídica nativa.

VARIANTES/HOMÓLOGOS/DERIVADOS

A presente invenção também inclui a utilização de variantes, homólogos e derivados de qualquer sequência de aminoácidos de uma enzima ou de qualquer sequência nucleotídica que codifica essa enzima.

Aqui, o termo “homólogo”, significa uma entidade possuindo uma certa homologia com as sequências de aminoácidos e as sequências nucleotídica. Aqui, o termo “homologia” pode ser igualado com “identidade”. De um modo adequado, neste contexto, “homólogas” refere-se à percentagem de identidade de sequência entre duas enzimas após alinhamento das suas sequências utilizando algoritmos de alinhamento como descrito abaixo em maior pormenor.

No presente contexto, uma sequência de aminoácidos homóloga é incluída numa sequência de aminoácidos que pode ser, pelo

menos, 75, 80, 81, 85 ou 90% idêntica, de um modo preferido, pelo menos, 95, 96, 97, 98 ou 99% idêntica à sequência. Tipicamente, os homólogos irão compreender os mesmos locais activos etc. - e. g., como a sequência de aminoácidos objecto. Apesar de a homologia poder também ser considerada em termos de semelhança (i. e., resíduos de aminoácidos possuindo propriedades/funções químicas semelhantes), no contexto da presente invenção é preferido expressar homologia em termos de identidade de sequência.

Por "fragmento funcional" entende-se um fragmento do polipéptido que continua a ter as propriedades características daquele polipéptido. No contexto da presente invenção, um fragmento funcional de uma enzima fitase é um fragmento que continua a ter capacidade de clivagem de carotenóide da proteína inteira.

No presente contexto, uma sequência nucleotídica homóloga é levada a incluir uma sequência nucleotídica que pode ser, pelo menos, 75, 80, 81, 85 ou 90% idêntica, de um modo preferido, pelo menos, 95, 96, 97, 98 ou 99% idêntica a uma sequência nucleotídica que codifica uma enzima da presente invenção (a sequência objecto). Tipicamente, os homólogos vão compreender as mesmas sequências que codificam para os locais activos etc., como a sequência objecto. Apesar de a homologia poder também ser considerada em termos de semelhança (i. e., resíduos de aminoácidos possuindo propriedades/funções químicas semelhantes), no contexto da presente invenção é preferido, expressar a homologia em termos de identidade de sequência.

Para as sequências de aminoácidos e sequências nucleotídicas, as comparações de homologia podem ser conduzidas

visualmente, ou mais habitualmente, com o auxílio de programas de comparação de sequências prontamente disponíveis. Estes programas de computador comercialmente disponíveis podem calcular a % de homologia entre duas ou mais sequências.

A % de homologia pode ser calculada sobre sequências contíguas, *i. e.*, uma sequência é alinhada com a outra sequência e cada aminoácido numa sequência é directamente comparado com o aminoácido correspondente na outra sequência, um resíduo de cada vez. Isto designa-se alinhamento “não hiatizado”. Tipicamente, esses alinhamentos não hiatizados são realizados apenas sobre um número relativamente pequeno de resíduos.

Apesar de este ser um método muito simples e consistente, ele falha tendo em consideração que, por exemplo, num par de sequências em tudo o mais idêntico, uma inserção ou remoção irá provocar que os seguintes resíduos de aminoácidos sejam colocados fora de alinhamento, resultando, deste modo, potencialmente numa larga redução em % de homologia quando é realizado um alinhamento global. Como consequência, a maioria dos métodos de comparação de sequências são designados para produzir alinhamentos óptimos que têm em consideração possíveis inserções e deleções sem penalizar indevidamente o resultado total de homologia. Isto é conseguido inserindo “hiatos” num alinhamento de sequência para tentar maximizar a homologia local.

No entanto, estes métodos mais complexos atribuem “penalidade de hiato” a cada hiato que ocorre no alinhamento tal que, para o mesmo número de aminoácidos idênticos, um alinhamento de sequência com tão poucos hiatos quanto possível - reflectindo maior falta de relação entre as duas sequências

comparadas - irá atingir um maior resultado do que um com muitos hiatos. "Custos de hiato ligados" são tipicamente utilizados carregando um custo relativamente elevado para a existência de um hiato e uma penalidade mais pequena para cada resíduo subsequente no hiato. Este é o sistema de soma de hiatos habitualmente utilizado. As penalidades de hiato elevadas irão, evidentemente, produzir alinhamentos otimizados com menores hiatos. Muitos programas de alinhamento permitem modificar as penalidades de hiato. No entanto, é preferido, utilizar os valores por defeito quando se utiliza esse software para comparações de sequências. Por exemplo quando se utiliza o pacote de GCG Wisconsin Bestfit, a penalidade de hiato em falta para a sequência de aminoácidos é -12 para um hiato e -4 para cada extensão.

Portanto, o cálculo da % de homologia máxima, necessita, em primeiro lugar, da produção de um alinhamento óptimo, tendo em consideração as penalidades de hiato. Um programa de computador adequado para realizar esse alinhamento é o pacote de GCG Wisconsin Bestfit (Devereux et al., 1984 Nuc. Acids Research 12 p. 387). Os exemplos de outros softwares que podem realizar comparações de sequências incluem, mas não são limitados ao pacote BLAST (ver Ausubel et al., 1999 *Short Protocols in Molecular Biology*, 4ª Ed - Chapter 18), FASTA (Altschul et al., 1990 *J. Mol. Biol.* 403-410) e as ferramentas de comparação adequadas. Tanto o BLAST como o FASTA estão disponíveis para pesquisa offline e online (ver Ausubel et al., 1999, *Short Protocols in Molecular Biology*, páginas 7-58 a 7-60).

No entanto, para algumas aplicações, é preferida a utilização do programa GCG Bestfit. Uma nova ferramenta, designada Sequências BLAST 2, está também disponível para

comparar proteína e sequência nucleotídica (ver *FEMS Microbiol Lett* 1999 174(2): 247-50; *FEMS Microbiol Lett* 1999 177(1): 187-8 e tatiana@ncbi.nlm.nih.gov).

Apesar de a % de homologia final poder ser medida em termos de identidade, o seu processo de alinhamento não é tipicamente baseado em todos ou nenhuns pares de comparação. Em vez disso, uma matriz de classificação de semelhança escalada que é geralmente utilizada que atribui resultados a cada comparação de par contrário baseada na semelhança química ou distância evolucionária. Um exemplo de tal matriz habitualmente utilizada é a matriz BLOSUM62 - a matriz por defeito para o BLAST adequado de programas. Os programas GCG Wisconsin utilizam, geralmente, os valores públicos por defeito ou uma tabela de comparação de símbolos habituais, se fornecida (ver o manual de utilizador para mais pormenores). Para algumas aplicações, é preferido, utilizar os valores públicos por defeito para o folheto de GCG, ou no caso de outro software, a matriz por defeito, tal como BLOSUM62.

De um modo alternativo, as percentagens de homologias podem ser calculadas utilizando as múltiplas características de alinhamento em DNASIS^(TM) (Hitachi Software), com base num algoritmo, análogo a CLUSTAL (Higgins DG & Sharp PM (1988), *Gene* 73(1), 237-244).

Uma vez que o software tenha produzido um óptimo alinhamento, é possível calcular a % de homologia, de um modo preferido, a % de identidade de sequência. Tipicamente, o software faz isto como parte da comparação de sequência e gera um resultado numérico.

Num aspecto preferido da presente invenção, são utilizados os seguintes software e posições para calcular a percentagem de homologia/identidade de sequência. Para percentagens de identidades de sequências de aminoácidos (homologia) ou “positivas” são calculadas pelo AlignX VectorNTI (Vector NTI Advance 9.1 de Invitrogen Corporation, Carlsbad, Califórnia, EUA) para cada par possível da sequência de aminoácidos. As posições são parâmetros por defeito (penalidade abrindo o Hiato - 10, penalidade de extensão de Hiato 0,1).

Para percentagens de sequências de ácido nucleico de identidades (homologia) ou “positivas” são calculadas pelo programa AlignX VectorNTI de Informax Inc. (EUA) para cada par possível das sequências de ácido nucleico. As posições são posições por defeito para ADN são: penalidade abrindo o Hiato: 15 e penalidade de extensão de Hiato: 6.66. (as mesmas posições para alinhamentos múltiplos).

De um modo preferido, a identidade (homologia) de aminoácidos é calculada ao longo de todo o comprimento de sequência de aminoácidos ou para ácido nucleico para um polinucleótido correspondente que codifica a respectiva sequência de aminoácidos de comprimento completo.

As sequências podem também possuir deleções, inserções ou substituições de resíduos de aminoácidos que produzem uma alteração silenciosa e resultam numa substância funcionalmente equivalente. As substituições de aminoácidos deliberadas podem ser feitas com base na semelhança em propriedades de aminoácidos (tais como polaridade, carga, solubilidade, hidrofobicidade, hidrofiliabilidade e/ou natureza anfipática dos resíduos) e é, portanto, útil para agrupar aminoácidos em grupos funcionais. Os

aminoácidos podem ser agrupados juntos com base nas propriedades da cadeia lateral isolada. No entanto, é mais útil incluir também dados de mutação. Os conjuntos de aminoácidos derivados deste modo são igualmente conservados por razões estruturais. Estes conjuntos podem ser descritos na forma de um diagrama de Venn (Livingstone CD. e Barton GJ. (1993) *"Protein sequence alignments: a strategy for the hierarchical analysis of residual conservation"* Comput.Appl Biosci. 9: 745-756) (Taylor W.R. (1986) *"The classification of amino acid conservation"* J.Theor.Biol. 119; 205-218). As substituições conservadoras podem ser feitas, por exemplo de acordo com a tabela abaixo que descreve um diagrama de Venn, geralmente aceite, de agrupamento de aminoácidos.

CONJUNTO		SUB-CONJUNTO	
Hidrofóbico	F W Y H K M I L V A G C	Aromático	F W Y H
		Alifático	I L V
Polar	W Y H K R E D C S T N Q	Carregado	H K R E D
		Positivamente carregado	H K R
		Negativamente carregado	E D
Pequeno	V C A G S P T N D	Simplificado	A G S

A presente invenção também inclui substituição homóloga (substituição e recolocação são ambos aqui utilizados para significar a troca de um resíduo de aminoácido existente com um resíduo alternativo) que pode ocorrer *i. e.*, substituição de semelhante para semelhante, tal como básico para básico, ácido para ácido, polar para polar etc. A substituição não-homóloga pode também ocorrer, *i. e.*, a partir de uma classe de resíduo

para outra ou, alternativamente, envolvendo a inclusão de aminoácidos não naturais, tais como ornitina (daqui em diante referido como Z), ácido diaminobutírico de ornitina (daqui em diante referido como B), ornitina norleucina (daqui em diante referido como O), pirilalanina, tienilalanina, naftilalanina e fenilglicina.

As substituições podem também ser feitas por aminoácidos não naturais.

As sequências de aminoácidos variantes podem incluir grupos espaçadores adequados que podem ser inseridos entre quaisquer dois resíduos de aminoácidos de uma sequência incluindo grupos alquilo, tais como grupos metilo, etilo ou propilo, além de espaçadores de aminoácidos, tais como resíduos de glicina ou β -alanina. Uma outra forma de variação envolve a presença de um ou mais resíduos de aminoácido em forma peptóide, serão bem compreendidos pelos especialistas na técnica. Para eliminar dúvidas, "a forma peptóide" é utilizada para se referir à variante de resíduos de aminoácido em que o grupo substituinte α -carbono está no resíduo do átomo de azoto antes do α -carbono. Os processos para preparar péptidos na forma peptóide são conhecidos na técnica, por exemplo Simon RJ *et al.*, *PNAS* (1992) 89(20), 9367-9371 e Horwell DC, *Trends Biotechnol* (1995) 13(4), 132-134.

As sequências nucleotídicas para utilização na presente invenção podem incluir dentro delas nucleótidos sintéticos ou modificados. São conhecidos na técnica uma variedade de diferentes tipos de modificações a oligonucleótidos. Estes incluem esqueletos metilfosfonato e fosforotioato e/ou a adição de cadeias de cridina ou polilisina nas extremidades 3' e/ou 5'

da molécula. Para as finalidades da presente invenção, deve ser entendido que as sequências nucleotídicas como aqui descritas podem ser modificadas por qualquer método disponível na técnica. Essas modificações podem ser realizadas de modo a melhorar a actividade *in vivo* ou tempo de vida de sequências nucleotídicas da presente invenção.

A presente invenção também abrange a utilização de sequência nucleotídicas que são complementares às sequências aqui apresentadas ou qualquer derivado, fragmento ou seu derivado. Se a sequência é complementar a um seu fragmento, então a sequência pode ser utilizada com uma sonda para identificar sequências codificantes semelhantes noutros organismos etc.

Os polinucleótidos que não são 100% homólogos às sequências da presente invenção mas estão dentro do âmbito da invenção podem ser obtidos de vários modos. Outras variantes da sequência como aqui descritas podem ser obtidas, por exemplo, por detecção com sonda de bibliotecas de ADN feitas a partir de uma gama de indivíduos, por exemplo, indivíduos de diferentes populações. Além disso, outros homólogos podem ser obtidos e esses homólogos e seus fragmentos, em geral, serão capazes de hibridar selectivamente às sequências aqui apresentadas numa lista de sequências. Essas sequências podem ser obtidas por detecção por sonda feita a partir de bibliotecas de ADNc ou bibliotecas de ADN genómico de outras espécies e por detecção com sonda dessas bibliotecas com sondas compreendendo todas, ou partes, de qualquer das sequências nas listagens de sequência anexas sob condições de meio de alta restringência. Considerações semelhantes aplicam-se para obter espécies homólogas e variantes alélicas do polipéptido ou sequências nucleotídicas da invenção.

As variantes e estirpes/espécie homólogas podem ser obtidas utilizando PCR degenerada que irá utilizar iniciadores designados para sequências alvo dentro das variantes e homólogos que codifica sequências de aminoácidos conservadas dentro das sequências da presente invenção. As sequências conservadas podem ser previstas, por exemplo, alinhando as sequências de aminoácidos a partir de várias variantes/homólogos. Os alinhamentos de sequências podem ser realizados utilizando software de computador conhecido na técnica. Por exemplo, é vastamente utilizado o programa GCG Wisconsin PileUp.

Os iniciadores utilizados em PCR degenerada irão conter uma ou mais posições degeneradas e serão utilizados a condições restritivas mais baixas do que as utilizadas para sequências de clonagem com iniciadores de sequência simples contra sequências conhecidas.

De um modo alternativo, esses polinucleótidos podem ser obtidos por mutagénese dirigida ao local das sequências caracterizadas. Isto pode ser útil onde, por exemplo, as alterações de sequência do códon silencioso são necessárias para otimizar preferências de códon para uma célula hospedeira particular, em que as sequências polinucleotídicas eram expressas. Outras alterações de sequência podem ser pretendidas de modo a introduzir locais de reconhecimento de enzimas de restrição ou para alterar a propriedade ou função dos polipéptidos codificados pelos polinucleótidos.

Os polinucleótidos (sequências nucleotídicas) da invenção podem ser utilizados para produzir um iniciador, e. g. um iniciador de PCR, um iniciador para uma reacção de amplificação alternativa, uma sonda e. g., marcada com um marcador revelador

por meios convencionais utilizando marcadores radioactivos ou não radioactivos, ou os polinucleótidos podem ser clonados para vectores. Esses iniciadores, sondas e outros fragmentos serão pelo menos, 15, de um modo preferido, pelo menos, 20, por exemplo, pelo menos, 25, 30 ou 40 nucleótidos em comprimento, e são também incluídos pelo termo polinucleótidos da invenção como aqui utilizado.

Os polinucleótidos, tais como polinucleótidos de ADN e sondas, de acordo com a invenção, podem ser produzidos recombinantemente, sinteticamente ou por quaisquer meios disponíveis para os especialistas na técnica. Podem também ser clonados por técnicas padrão.

Em geral, os iniciadores serão produzidos por meios sintéticos envolvendo um fabrico passo a passo da sequência de ácidos nucleicos pretendida, um nucleótido de cada vez. As técnicas para conseguir estas técnicas automáticas utilizadas estão facilmente disponíveis na técnica.

Os polinucleótidos mais longos serão, em geral, produzidos utilizando meios recombinantes, por exemplo, utilizando técnicas de clonagem de PCR (reacção de polimerização em cadeia). Os iniciadores podem ser desenhados para conter locais de reconhecimento de enzimas de restrição adequados de modo a que o ADN amplificado pode ser clonado num vector de clonagem adequado.

BIOLOGICAMENTE ACTIVA

De um modo preferido, as sequências variantes etc., são,

pelo menos, tão biologicamente activas como as sequências aqui apresentadas.

Como aqui utilizado, “biologicamente activa” refere-se a uma sequência possuindo uma função estrutural semelhante (mas não necessariamente ao mesmo grau) e/ou função reguladora semelhante (mas não necessariamente ao mesmo grau) e/ou função bioquímica semelhante (mas não necessariamente ao mesmo grau) das sequências que ocorrem naturalmente.

Em particular, as sequências variantes ou suas formas modificadas possuem um perfil enzimático semelhante ao perfil da fitase aqui identificada. Este perfil inclui características, tais como sendo uma proteína secretada, possuindo um pH óptimo na gama de pH 2 a 5,5, de um modo preferido, 4,0-4,5, permanecendo, pelo menos, 50% da actividade máxima sobre a gama de pH 2,0-5,5 e/ou possuindo uma actividade específica acima de 300 U/mg.

HIBRIDAÇÃO

A presente invenção também abrange sequências que são complementares às sequências de ácido nucleico da presente invenção ou sequências que são capazes de hibridar às sequências da presente invenção ou a sequências complementares a essa.

O termo “hibridação”, como aqui utilizado, deve incluir “o processo pelo qual uma cadeia de ácido nucleico se junta com uma cadeia complementar através de emparelhamento de base” bem como o processo de amplificação como realizado em tecnologias de reacção de polimerização em cadeia (PCR).

A presente invenção também inclui a utilização de sequências nucleotídicas que são capazes de hibridar às sequências que são complementares às sequências aqui apresentadas ou qualquer derivado, fragmento ou seu derivado.

O termo “variante” também inclui sequências que são complementares às sequências que são capazes de hibridar às sequências nucleotídicas aqui apresentadas.

De um modo preferido, o termo “variante” inclui sequências que são complementares a sequências que são capazes de hibridar sob condições restritivas (e. g., 50 °C e 0,2x SSC {1x SSC = NaCl 0,15 M, citrato de Na₃ 0,015 M pH 7,0}) às sequências nucleotídicas aqui apresentadas.

De um modo mais preferido, o termo “variante” inclui sequências que são complementares a sequências que são capazes de hibridar sob condições restritiva altas (e. g., 65 °C e 0,1x SSC {1x SSC = NaCl 0,15 M, citrato de Na₃ 0,015 M pH 7,0}) às sequências nucleotídicas aqui apresentadas.

A presente invenção também se refere a sequências nucleotídicas que podem hibridar às sequências nucleotídicas da presente invenção (incluindo sequências complementares àquelas aqui apresentadas).

A presente invenção também se refere a sequências nucleotídicas que são complementares a sequências que podem hibridar às sequências nucleotídicas da presente invenção (incluindo sequências complementares àquelas aqui apresentadas).

São também incluídas dentro do âmbito da presente invenção sequências polinucleotídicas que são capazes de hibridar às sequências nucleotídicas aqui apresentadas sob condições de restringência intermédia a máxima.

Num aspecto preferido, a presente invenção cobre sequências nucleotídicas que podem hibridar à sequência nucleotídica da presente invenção ou o seu complemento, sob condições restritivas (e. g. 50 °C e 0,2x SSC).

Num aspecto mais preferido, a presente invenção cobre sequências nucleotídicas que podem hibridar à sequência nucleotídica da presente invenção ou o seu complemento, sob condições restritivas altas (e. g. 65 °C e 0,1x SSC).

MUTAGÉNESE DIRIGIDA AO LOCAL

Uma vez que uma sequência nucleotídica que codifica enzima foi isolada e/ou purificada, ou uma sequência nucleotídica que codifica enzima putativa foi identificada, pode ser pretendido mudar a sequência de modo a preparar uma enzima codificada pelas moléculas de ácido nucleico isoladas da presente invenção.

As mutações podem ser introduzidas utilizando oligonucleótidos sintéticos. Estes oligonucleótidos contêm sequências nucleotídicas flanqueando os locais de mutação pretendidos.

Um método adequado é divulgado em Morinaga *et al.*, {*Biotechnology* (1984) 2, p. 646- 649}. Outro método de introdução de mutações numa sequência nucleotídica que codifica

enzima é descrito em Nelson e Long (*Analytical Biochemistry* (1989), 180, p 147-151). Um outro método é descrito em Sarkar e Sommer (*Biotechniques* (1990), 8, p404-407 - "*The megaprimer method of site directed mutagenesis*").

RECOMBINANTE

Num aspecto da sequência para utilização na presente invenção é uma sequência recombinante - *i. e.*, uma sequência que foi preparada utilizando técnicas de ADN recombinante.

Estas técnicas de ADN recombinante estão dentro das capacidades de um especialista na técnica. Essas técnicas são explicadas na literatura, por exemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch e T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edição, Livros 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SINTÉTICA

Num aspecto, a sequência para utilização na presente invenção é uma sequência sintética - *i. e.*, uma sequência que foi preparada por síntese química ou enzimática *in vitro*. Isso inclui, mas não é limitado a, sequências feitas com utilização de códons óptimos para organismos hospedeiros - tais como leveduras metilotróficas *Pichia* e *Hansenula*.

EXPRESSÃO DE ENZIMAS

A sequência nucleotídica para utilização na presente invenção pode ser incorporada num vector replicável recombinante. O vector pode ser utilizado para replicar e expressar a sequência nucleotídica, em forma de enzima, em e/ou a partir de uma célula hospedeira compatível.

A expressão pode ser controlada utilizando sequências de controlo e. g., sequências reguladoras.

A enzima produzida por uma célula hospedeira recombinante por expressão da sequência nucleotídica pode ser secretada ou pode estar contida intracelularmente dependendo da sequência e/ou do vector utilizado. As sequências que codificam podem ser designadas com sequências de sinal que melhoram a secreção directa da substância que codifica sequências através de uma membrana celular particular procariótica ou eucariótica.

De modo vantajoso, as enzimas da presente invenção são secretadas.

VECTOR DE EXPRESSÃO

Os termos "plasmídeo", "sistema de vector" ou "vector de expressão" significam uma construção capaz de expressão *in vivo* ou *in vitro*. No contexto da presente invenção, estas construções podem ser utilizadas para introduzir genes que codificam enzimas para células hospedeiras. De um modo adequado, os genes cuja expressão é introduzida podem ser referidos como "transgenes expressíveis".

De um modo preferido, o vector de expressão é incorporado no

genoma de um organismo hospedeiro adequado. O termo "incorporado", de um modo preferido, cobre incorporação estável no genoma.

As sequências nucleotídicas aqui descritas, incluindo a sequência nucleotídica da presente invenção, podem estar presentes num vector em que a sequência nucleotídica é operacionalmente ligada a sequências reguladoras capazes de proporcionar a expressão da sequência nucleotídica por um organismo hospedeiro adequado.

Os vectores para utilização na presente invenção podem ser transformados numa célula hospedeira adequada, como descrita abaixo, para proporcionar a expressão de um polipéptido da presente invenção.

A escolha de vector e. g., um vector de plasmídeo, cosmídeo ou fago irá, muitas vezes, depender da célula hospedeira na qual será introduzido.

Os vectores para utilização na presente invenção podem conter um ou mais genes marcadores seleccionáveis - tais como um gene que confere resistência a antibiótico e. g., resistência a ampicilina, canamicina, cloramfenicol ou tetraciclina. De um modo alternativo, a selecção pode ser conseguida por co-transformação (como descrito no documento W091/17243).

Os vectores podem ser utilizados *in vitro*, por exemplo, para a produção de ARN ou utilizados para transfectar, transformar, traduzir ou infectar uma célula hospedeira.

Deste modo, numa forma de realização adicional, a invenção

proporciona um método de realização de sequências nucleotídicas da presente invenção por introdução de uma sequência nucleotídica da presente invenção num vector replicável, introduzindo o vector numa célula hospedeira compatível e fazendo crescer a célula hospedeira sob condições que levam à replicação do vector.

O vector pode ainda compreender uma sequência nucleotídica permitindo ao vector replicar-se na célula hospedeira em questão. Os exemplos dessas sequências são as origens de replicação de plasmídeos pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1, pIJ101, pTZ12 e pET11.

SEQUÊNCIAS REGULADORAS

Em algumas aplicações, a sequência nucleotídica para utilização na presente invenção é operacionalmente ligada a uma sequência reguladora que é capaz de proporcionar para a expressão da sequência nucleotídica, tal como pela escolha da célula hospedeira. A título de exemplo, a presente invenção cobre um vector compreendendo a sequência nucleotídica da presente invenção operacionalmente ligada a essa sequência reguladora, *i. e.*, o vector é um vector de expressão.

O termo "operacionalmente ligada" refere-se a uma justaposição em que os componentes descritos estão numa relação que lhes permite funcionar na sua forma pretendida. Uma sequência reguladora "operacionalmente ligada" a uma sequência que codificam está ligada de tal modo que a expressão da sequência que codifica é conseguida sob condições compatíveis com as sequências de controlo.

O termo "sequências reguladoras" inclui promotores e agentes de intensificação e outros sinais de regulação de expressão.

O termo "promotor" é utilizado no sentido normal da técnica, e. g., um local de ligação de ARN polimerase.

A expressão intensificada da sequência nucleotídica que codifica a enzima da presente invenção pode também ser conseguida por selecção de regiões reguladoras heterólogas, e. g., promotor, líder de secreção e regiões terminadoras.

De um modo preferido, a sequência nucleotídica de acordo com a presente invenção é operacionalmente ligada a, pelo menos, um promotor.

Os exemplos de promotores adequados para direccionar a transcrição da sequência nucleotídica numa bactéria, fungo ou hospedeiro de levedura são bem conhecidos na técnica.

CONSTRUÇÕES

O termo "construção" - que é sinónimo de termos, tais como "conjugado", "cassette" e "híbrido" - inclui uma sequência nucleotídica para utilização de acordo com a presente invenção directa ou indirectamente ligados a um promotor.

Um exemplo de uma ligação indirecta é a provisão de um grupo espaçador adequado, tal como uma sequência de intrão, tal como o intrão Sh-1 ou o intrão ADH, intermediário entre o promotor e a sequência nucleotídica da presente invenção. O mesmo se aplica

ao termo “fundido” em relação à presente invenção que inclui ligação directa ou indirecta. Em alguns casos, os termos não cobrem a combinação natural da sequência nucleotídica que codifica para a proteína ordinariamente associada com o promotor de gene de tipo selvagem e quando estão ambos no seu ambiente natural.

A construção pode ainda conter ou expressar um marcador, que permite a selecção da construção genética.

Para algumas aplicações, de um modo preferido, a construção da presente invenção compreende, pelo menos, a sequência nucleotídica da presente invenção operacionalmente ligada a um promotor.

CÉLULAS HOSPEDEIRAS

O termo “célula hospedeira” - em relação à presente invenção, inclui qualquer célula que compreende a sequência nucleotídica ou um vector de expressão como acima descrito e que é utilizado na produção recombinante de uma enzima possuindo as propriedades específicas como aqui definidas ou nos métodos da presente invenção.

Deste modo, uma forma de realização adicional da presente invenção proporciona células hospedeiras transformadas ou transfectadas com uma sequência nucleotídica que expressa as enzimas descritas na presente invenção. As células serão escolhidas para serem compatíveis com o referido vector e podem ser, por exemplo, procarióticas (por exemplo, bactérias), fungos, leveduras ou células de plantas. De um modo preferido,

as células hospedeiras não são células humanas.

Os exemplos de organismos hospedeiros bacterianos adequados são as espécies de bactérias gram positivas ou gram negativas.

Numa forma de realização preferida, a célula hospedeira é *Escherichia Coli* uma vez que se observou que a fitase *Buttiauxella* P1-29 é eficientemente secretada em *E. coli*. As enzimas fitase, incluindo variantes foram caracterizadas após expressão heteróloga em um ou mais dos seguintes hospedeiros de expressão: *Escherichia coli* K12; *Bacillus subtilis*; *Saccharomyces cerevisiae*. Estes hospedeiros são, portanto, também preferidos.

Dependendo da natureza da sequência nucleotídica que codifica a enzima da presente invenção e/ou a incapacidade para outro processamento da proteína expressa, podem ser preferidos hospedeiros eucarióticos, tais como leveduras ou outros fungos. Em geral, as células de leveduras são preferidas sobre células de fungos porque são mais fáceis de manipular. No entanto, algumas proteínas são fracamente secretadas a partir da célula de levedura ou, em alguns casos, não são processadas de modo apropriado (e. g., hiperglicosilação em leveduras). Nestes exemplos, deve ser seleccionado um organismo hospedeiro fúngico diferente.

A utilização de células hospedeiras adequadas - tais como leveduras, fungos e células hospedeiras de plantas - pode proporcionar modificações pós-tradução (e. g., miristoilação, glicosilação, truncagem, lapidação e fosforilação de tirosina, serina ou treonina) uma vez que podem ser necessárias para conferir actividade biológica óptima em produtos de expressão

recombinante da presente invenção.

A célula hospedeira pode ser uma protease deficiente ou estirpe de protease negativa.

O genótipo da célula hospedeira pode ser modificado para melhorar a expressão.

Os exemplos de modificações de célula hospedeira incluem deficiência de protease, suplementação de ARNt raros e modificação do potencial redutivo no citoplasma para melhorar a formação de ligações dissulfito.

Por exemplo, a célula hospedeira de *E. coli* pode sobreexpressar ARNt raros para melhorar a expressão de proteínas heterólogas, como exemplificado/descrito em Kane (*Curr Opin Biotechnol* (1995), 6, 494-500 "*Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in E.coli*"). A célula hospedeira pode ser deficiente em várias enzimas redutoras favorecendo, deste modo, a formação de ligações dissulfito estáveis como exemplificado/descrito em Besette (*Proc Natl Acad Sci USA* (1999), 96, 13703-13708 "*Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm*").

Numa forma de realização, as células hospedeiras, no contexto da presente invenção, incluem aquelas células que podem ser adicionadas directamente em rações animais.

ORGANISMO

O termo "organismo", em relação à presente invenção, inclui qualquer organismo que possa compreender a sequência nucleotídica que codifica para as enzimas, como descritas na presente invenção e/ou produtos dela obtidos e/ou, em que um promotor possa permitir a expressão da sequência nucleotídica, de acordo com a presente invenção, quando presente no organismo.

Os organismos adequados podem incluir um procariótico, fungo, levedura ou uma planta.

O termo "organismo transgênico", em relação à presente invenção, inclui qualquer organismo que compreende a sequência nucleotídica que codifica para as enzimas como descritas na presente invenção e/ou os produtos dela obtidos e/ou onde um promotor pode permitir a expressão da sequência nucleotídica de acordo com a presente invenção, dentro do organismo. De um modo preferido, a sequência nucleotídica é incorporada no genoma do organismo.

O termo "organismo transgênico" não cobre nucleótidos nativos que codificam sequências no seu ambiente natural quando estão sob o controle do seu promotor nativo que está, também, no seu ambiente natural.

Portanto, o organismo transgênico da presente invenção inclui um organismo compreendendo qualquer uma de, ou combinações da, sequência nucleotídica que codifica para as enzimas, como aqui descritas, construções de acordo com a presente invenção, vectores de acordo com a presente invenção, plasmídeos de acordo com a presente invenção, células de acordo

com a presente invenção, tecidos de acordo com a presente invenção ou os seus produtos.

Por exemplo, o organismo transgénico pode também compreender a sequência nucleotídica que codifica para a enzima da presente invenção sob o controlo de um promotor heterólogo.

TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS/ORGANISMOS HOSPEDEIROS

Como indicado anteriormente, o organismo hospedeiro pode ser um organismo procariótico ou eucariótico. Os exemplos de hospedeiros procarióticos adequados incluem *E. coli* e *Bacillus subtilis*.

Os ensinamentos sobre a transformação de hospedeiros procarióticos é bem documentada na técnica, por exemplo, ver Sambrook *et al.*, (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edição, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Outros métodos adequados são expostos aqui nos Exemplos. Se um hospedeiro procariótico é utilizado, então, a sequência nucleotídica pode necessitar de ser, de um modo adequado, modificada antes de transformação - tal como por remoção de intrões.

As células de fungos filamentosos podem ser transformadas utilizando vários métodos conhecidos na técnica - tais como um processo envolvendo formação de protoplastos e transformação dos protoplastos seguida por regeneração da parede celular de um modo conhecido. A utilização de *Aspergillus* como microrganismo hospedeiro é descrita no documento EP 0238023.

Outro organismo hospedeiro pode ser uma planta. Uma revisão das técnicas gerais utilizadas para transformação de plantas pode ser encontrada em artigos por Potrykus (*Annu Rev Plant Pisiol Plant Mol Biol* [1991] 42:205-225) e Christou (*Agro-Food-Industry Hi-Tech* Março/Abril 1994 17-27). Outros ensinamentos sobre transformação de plantas podem ser encontrados no documento EP-A-0449375.

Os ensinamentos gerais sobre transformação de fungos, leveduras e plantas são apresentados nas secções seguintes.

FUNGOS TRANSFORMADOS

Um organismo hospedeiro pode ser um fungo - tal como um fungo filamentoso. Os exemplos desses hospedeiros adequados incluem qualquer membro pertencente ao género *Thermomices*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Neurospora*, *Trichoderma* e semelhantes.

Os ensinamentos de transformação de fungos filamentosos são revistos no documento US-A-5741665, que afirma que as técnicas padrão para transformação de fungos filamentosos e cultura de fungos são bem conhecidas na técnica. É encontrada uma revisão extensa de técnicas como aplicadas a *N. crassa*, por exemplo, em Davis e de Serres, *Methods Enzymol* (1971) 17A: 79-143.

São revistos outros ensinamentos de transformação de fungos filamentosos no documento US-A-5674707.

Num aspecto, o organismo hospedeiro pode ser do género *Aspergillus*, tal como *Aspergillus niger*.

Um *Aspergillus* transgénico, de acordo com a presente invenção, pode também ser preparado pelo seguinte, por exemplo, os ensinamentos de Turner G. 1994 (*Vectors for genetic manipulation*. In: Martinelli S.D., Kinghorn J.R. (Editores) *Aspergillus: 50 years on. Progress in industrial microbiology* vol 29. Elsevier, Amesterdão 1994. p. 641-666).

A expressão génica em fungos filamentosos foi revista em Punt et al., (2002) *Trends Biotechnol* Maio de 2002; 20(5):200-6, Archer & Peberdy *Crit Rev Biotechnol* (1997) 17(4):273-306.

LEVEDURAS TRANSFORMADAS

Noutra forma de realização, o organismo transgénico pode ser uma levedura.

Uma revisão dos princípios de expressão génica heteróloga em leveduras são proporcionados em, por exemplo, *Methods Mol Biol* (1995), 49:341-54, e *Curr Opin Biotechnol* (1997) Out; 8(5):554-60.

Neste ponto, a levedura - tal como as espécies *Saccharomyces cerevisi* ou *Pichia pastoris* (ver *FEMS Microbiol Rev* (2000 24(1):45-66), pode ser utilizada como um veículo para expressão génica heteróloga.

Uma revisão dos princípios de expressão génica heteróloga em *Saccharomyces cerevisiae* e secreção de produtos génicos é dada por E Hinchcliffe E Kenny (1993, "Yeast as a vehicle for the expression of heterologous genes", *Yeasts*, Vol 5, Anthony H Rose

e J Stuart Harrison, eds, 2ª edição, Academic Press Ltd.).

Para a transformação de leveduras, foram desenvolvidos vários protocolos de transformação. Por exemplo, um transgênico de *Saccharomyces*, de acordo com a presente invenção, pode ser preparado pelos seguintes ensinamentos de Hinnen et al., (1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 75, 1929); Beggs, J D (1978, *Nature*, Londres, 275,104); e Ito, H et al., (1983, *J Bacteriology* 153, 163-168).

As células de leveduras transformadas podem ser seleccionadas utilizando vários marcadores selectivos - tais como marcadores de resistência a antibióticos dominantes de marcadores auxotróficos.

PLANTAS TRANSFORMADAS/CÉLULAS VEGETAIS

Um organismo hospedeiro adequado para a presente invenção pode ser uma planta. Pode ser encontrada uma revisão das técnicas gerais em artigos por Potrykus (*Annu Rev Plant Pisiol Plant Mol Biol* [1991] 42:205-225) e Christou (*Agro-Food-Industry Hi-Tech* Março/Abril 1994 17-27)

CULTURA E PRODUÇÃO

As células hospedeiras transformadas com a sequência nucleotídica da presente invenção podem ser cultivadas sob condições que podem conduzir à produção da enzima codificada e que facilitam a recuperação da enzima a partir das células e/ou meio de cultura.

O meio utilizado para cultivar as células pode ser qualquer meio convencional adequado para crescimento da célula hospedeira em questão e obtendo expressão da enzima.

A proteína produzida por uma célula recombinante pode ser apresentada na superfície da célula.

A enzima pode ser secretada a partir das células hospedeiras e pode ser convenientemente recuperada a partir do meio de cultura utilizando processos bem conhecidos.

SECREÇÃO

Pode ser pretendido, para a enzima, ser secretada a partir de um hospedeiro de expressão para o meio de cultura a partir de onde a enzima pode ser mais facilmente recuperada. De acordo com a presente invenção, a secreção de sequência líder pode ser seleccionada com base no hospedeiro de expressão pretendido. As sequências de sinal híbrido podem também ser utilizadas com o contexto da presente invenção.

Os exemplos típicos de sequências líder de secreção heteróloga são aqueles originários a partir do gene (*glaA* - 18 e 24 versões de aminoácidos e. g., a partir de *Aspergillus*) de amiloglucosidase fúngica (AG), o gene de factor-a (leveduras e. g., *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* e *Hansenula*) ou o gene de α -amilase (*Bacillus*).

A título de exemplo, a secreção de proteínas heterólogas em *E. coli* é revista em *Methods Enzymol* (1990) 182:132-43.

DETECÇÃO

São conhecidos na técnica uma variedade de protocolos para detectar e medir a expressão da sequência de aminoácidos. Os exemplos incluem ensaio de imunoabsorção (ELISA), radioimunoensaio (RIA) e classificação de célula activada fluorescente (FACS).

Uma vasta variedade de marcadores e técnicas de conjugação são conhecidas pelos especialistas na técnica e podem ser utilizadas em vários ensaios de ácidos nucleicos e aminoácidos.

Uma variedade de empresas, tais como Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ), Promega (Madison, WI) e US Biochemical Corp (Cleveland, OH) fornece kits e protocolos comerciais para estes processos.

As moléculas repórter ou marcadores adequados incluem aqueles radionuclídeos, enzimas, fluorescentes, quimioluminescentes ou agentes cromogénicos bem como substratos, co-factores, inibidores, partículas magnéticas e semelhantes. As patentes que ensinam a utilização desses marcadores incluem os documentos US-A-3817837; US-A-3850752; US-A-3939350; US-A-3996345; US-A-4277437; US-A-4275149 e US-A-4366241.

Também as imunoglobulinas recombinantes podem ser produzidas como mostrado no documento US-A-4816567.

Outros ensaios adequados para detectar actividade de fitase são conhecidas na técnica e aqui identificadas.

PROTEÍNAS DE FUSÃO

As sequências de aminoácidos codificadas pelas moléculas de ácido nucleico isoladas para utilização de acordo com a presente invenção podem ser produzidas como uma proteína de fusão, por exemplo, para auxiliar em extracção e purificação. Exemplos de acompanhantes de proteínas de fusão incluem glutathione-transferase (GST), 6xHis, GAL4 (ligação de ADN e/ou domínios de activação transcricional) e (β -galactosidade). Pode também ser conveniente incluir um local de clivagem proteolítica entre a acompanhante de proteína de fusão e a sequência de proteínas de interesse para permitir remover sequências de proteínas de fusão.

De um modo preferido, a proteína de fusão não irá prejudicar a actividade da sequência de proteína.

Os sistemas de expressão de fusão génica em *E. coli* foram revistos em *Curr Opin Biotechnol* (1995) 6(5):501-6.

Noutra forma de realização da invenção, a sequência de aminoácidos codificada pelas moléculas de ácido nucleico da presente invenção pode ser ligada a uma sequência heteróloga para codificar uma proteína de fusão. Por exemplo, para rastrear bibliotecas de péptidos para agentes capazes de afectar a actividade de substância, pode ser útil codificar uma substância quimérica que expresse um epítopo heterólogo que é reconhecido por um anticorpo comercialmente disponível.

SEQUÊNCIAS ADICIONAIS

As sequências para utilização de acordo com a presente invenção podem também ser utilizadas em conjunto com uma ou mais proteínas adicionais de interesse (POI) ou sequências nucleotídicas de interesse (NOI).

Os exemplos não-limitantes de POI incluem: Xilanase, lipases, fosfatases ácidas e/ou outros. Estes incluem enzimas que, por exemplo, modulam a viscosidade da ração. A NOI pode ainda ser uma sequência antissentido para qualquer destas sequências.

A POI pode ainda ser uma proteína de fusão, por exemplo, para auxiliar em extração e purificação ou melhorar o metabolismo de fitato *in vivo*.

A POI pode ainda ser fundida a uma sequência de secreção.

Outras sequências podem também facilitar a secreção ou aumento do rendimento de POI secretado. Essas sequências podiam codificar para proteínas acompanhantes, como, por exemplo, o produto genético de *Aspergillus niger cyp B* descrito no pedido de patente UK 9821198.0.

A NOI que codifica para POI pode ser manipulada de modo a alterar a sua actividade por uma variedade de razões, incluindo mas não limitado a, alterações que modificam o processamento e/ou expressão do seu produto de expressão. A título de outro exemplo, a NOI pode também ser modificada para otimizar a expressão numa célula hospedeira particular. Podem ser pretendidas outras alterações de sequência de modo a introduzir

locais de reconhecimento de enzima de restrição.

A NOI que codifica para POI pode incluir dentro os seus nucleótidos sintéticos ou modificados - tais como esqueletos de demetilfosfonato e fosforotioato.

A NOI que codifica para a POI pode ser modificada para aumentar a estabilidade intracelular e semi-vida. As modificações possíveis incluem, mas não são limitadas a, a adição de sequências flanqueadoras das extremidades 5' e/ou 3' da molécula ou a utilização de fosforotioato ou 2' O-metil antes das ligações de fosfodiesterase dentro do esqueleto da molécula.

ANTICORPOS - apenas para ilustração

Um aspecto da presente descrição refere-se a aminoácidos que são imunologicamente reactivos com os aminoácidos de SEQ ID N°: 3.

Os anticorpos podem ser produzidos por técnicas padrão, tais como por imunização com a substância da invenção ou utilizando uma biblioteca de apresentação de fagos.

Para as finalidades desta invenção, o termo "anticorpo", salvo especificação em contrário, inclui mas não é limitado a, policlonal, monoclonal, quimérico, cadeia simples, fragmentos Fab, fragmentos produzidos por uma biblioteca de expressão Fab, bem como seus miméticos. Esses fragmentos incluem fragmentos de todos os anticorpos que mantêm a sua actividade aglutinante para uma substância alvo, fragmentos de Fv, F(ab') e F(ab')₂, bem como anticorpos de cadeia simples (scFv), proteínas de fusão e outras

proteínas sintéticas que compreendem o local de ligação antigénio do anticorpo. Além disso, os anticorpos e seus fragmentos podem ser anticorpos humanizados. Anticorpos neutralizantes, *i. e.*, aqueles que inibem a actividade biológica dos polipéptidos de substâncias são especialmente preferidos para diagnóstico e terapêutica.

Se os anticorpos policlonais são pretendidos, um mamífero seleccionado (*e. g.*, rato, coelho, veado, cavalo, etc.) é imunizado com a sequência da presente invenção (ou uma sequência compreendendo um seu epítipo imunológico). Dependendo das espécies hospedeiras, podem ser utilizados vários adjuvantes para aumentar a resposta imunológica.

O soro do animal imunizado é recolhido e tratado de acordo com processos conhecidos. Se o soro contendo anticorpos policlonais à sequência da presente invenção (ou uma sequência compreendendo um seu epítipo imunológico) contém anticorpos a outros antigénios, os anticorpos policlonais podem ser purificados por cromatografia de imunoafinidade. As técnicas para produção e processamento de antissoro policlonal são conhecidas na técnica. De modo a que esses anticorpos possam ser feitos, a invenção também proporciona polipéptidos da invenção ou seus fragmentos haptenisados a outro polipéptido para utilização como imunogénios em animais ou humanos.

Os anticorpos monoclonais direccionados contra a sequência da presente invenção (ou uma sequência compreendendo um seu epítipo imunológico) podem, também, ser rapidamente produzidos por um especialista na técnica e incluem, mas não são limitados a, a técnica de hibridoma de Koehler e Milstein (1975 *Nature* 256:495-497), a técnica de hibridoma de célula-B humana (Kosbor

et al., (1983) *Immunol Today* 4:72; Cote *et al.*, (1983) *Proc Natl Acad Sci* 80:2026-2030) e a técnica de hibridoma-EBV (Cole *et al.*, (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan Rickman Liss Inc, pp 77-96).

Além disso, podem ser utilizadas técnicas desenvolvidas para a produção de “anticorpos quiméricos”, a excisão de genes de anticorpo de rato a genes de anticorpo humano para obter uma molécula com especificidade e actividade biológica de antígeno apropriada (Morrison *et al.*, (1984) *Proc Natl Acad Sci* 81:6851-6855; Neuberger *et al.*, (1984) *Nature* 312:604-608; Takeda *et al.*, (1985) *Nature* 314:452-454).

De um modo alternativo, as técnicas descritas para a produção de anticorpos de cadeia simples (Patente US Nº 4946779) podem ser adaptadas para produzir os anticorpos de cadeia simples de substâncias específicas.

Podem também ser gerados fragmentos de anticorpo que contêm locais específicos de ligação para a substância. Por exemplo, esses fragmentos incluem, mas não são limitados a, os fragmentos $F(ab')_2$ que podem ser produzidos por digestão da pepsina da molécula de anticorpo e os fragmentos Fab que podem ser gerados por redução das pontes dissulfeto dos fragmentos $F(ab')_2$. De um modo alternativo, as bibliotecas de expressão Fab podem ser construídas para permitir a identificação rápida e fácil de fragmentos Fab monoclonais com a especificidade pretendida (Huse WD *et al.*, (1989) *Science* 256:1275-128 1).

APLICAÇÃO EM GRANDE ESCALA

Numa forma de realização preferida da presente invenção, a sequência de aminoácidos que codifica uma fitase derivada de *C. freundii* ou os métodos da presente invenção são utilizados para aplicações em grande escala. Em particular, os métodos da presente invenção podem ser utilizados para a produção em grande escala de fitases para utilização industrial como aditivos/suplementos para composições alimentares ou rações.

De um modo preferido, a sequência de aminoácidos é produzida numa quantidade de desde 5 g por litro a cerca de 10 g por litro do volume total de cultura celular após cultivo do organismo hospedeiro.

De um modo preferido, a sequência de aminoácidos é produzida numa quantidade de desde 100 mg por litro a cerca de 900 mg por litro do volume total de cultura celular após cultivo do organismo hospedeiro.

De um modo preferido, a sequência de aminoácidos é produzida numa quantidade de desde 250 mg por litro a cerca de 500 mg por litro do volume total de cultura celular após cultivo do organismo hospedeiro.

UTILIZAÇÃO DE FITASES – apenas para ilustração

Como referido acima, a presente descrição também se refere à produção de fitases como aqui descrito.

Em particular, a presente descrição também se refere à utilização de sequências de aminoácidos, como aqui divulgado, na produção de compostos de fosfato orgânico e inorgânico.

Deste modo, a presente invenção refere-se, ainda, à utilização das sequências nucleotídicas que codificam fitases, em gerar vectores de expressão ou sistemas para a expressão das fitases.

Além disso, a presente invenção refere-se à utilização desses vectores ou sistemas de expressão na geração de células hospedeiras que expressem fitases.

A descrição refere-se, ainda, à utilização de células hospedeiras modificadas na geração de precursores de compostos de fosfato orgânico e inorgânico ou na geração de compostos de fosfato orgânico específicos.

Os compostos de fosfato orgânico e inorgânico adequados incluem mio-inositol pentaquis-, tetraquis-, tris-, bis- e monofosfatos.

De um modo adequado, a descrição proporciona, portanto, um método de produção de um composto de fosfato orgânico compreendendo tratar um fitato com uma fitase derivada de *Buttiauxella* sp. De um modo preferido, o método é caracterizado por a enzima compreender as sequências de aminoácidos apresentadas como SEQ ID N°: 3 ou uma sequência possuindo, pelo menos, 75% de identidade (homologia) a esta ou um fragmento eficaz, ou sua forma modificada. De um modo adequado, o fosfato orgânico é fitato ou todos os possíveis estereoisómeros de mio-inositol di-, tri-, tetra e penta-fosfatos. Outros fosfatos

orgânicos adequados incluem tetrafosfatos de inositol e oligofosfatos de inositol. Numa forma de realização preferida, o método é um processo biotecnológico *in vivo*.

Esses métodos para produzir um composto de fosfato orgânico podem, de um modo adequado, compreender as etapas de:

- a) proporcionar uma célula hospedeira que compreende transgenes expressíveis compreendendo fitase *Buttiauxella sp.*;
- b) cultivar o organismo transgênico sob condições adequadas para expressão do transgene; e
- c) recuperar o composto de fosfato orgânico a partir da cultura.

Os compostos podem ser utilizados para uma variedade de aplicações incluindo em ensaios para a caracterização de fitases. Alguns fosfatos de inositol são envolvidos como moléculas sinal em regulação intracelular e podem ser utilizados químicos de pesquisa.

Noutro aspecto, é proporcionado um método para produção de alimentos ou rações animais. A ração animal é, tipicamente, produzida em moinhos de rações, em que as matérias-primas são primeiro moídas para um tamanho de partícula adequado e, então, misturadas com aditivos apropriados. A ração pode, então, ser produzida como calda ou aglomerado; o último envolve, tipicamente, um método pelo qual a temperatura é aumentada até um nível alvo e depois é passada através de uma fieira para produzir aglomerados de um tamanho particular. Subsequentemente,

podem ser adicionados aditivos líquidos, tais como gordura e enzima. Os aglomerados são deixados arrefecer antes do transporte. A produção de ração animal pode também envolver uma etapa adicional que inclui extrusão ou expansão antes de aglomerar.

Como consequência, a descrição proporciona ainda a utilização de uma sequência de aminoácidos que codificam uma fitase ou uma célula hospedeira que expressa uma fitase, para produzir uma fitase para utilização na preparação de um produto alimentar ou ração. Num aspecto, é proporcionada uma utilização de uma sequência de aminoácidos, como aqui descrita, na preparação de um produto alimentar ou ração. Noutro aspecto, é proporcionada uma utilização de uma célula hospedeira, de acordo com a invenção, na preparação de um produto alimentar ou ração. Noutro aspecto, é proporcionada uma utilização de um vector ou sistema de expressão, de acordo com a invenção, na preparação de um produto alimentar ou ração.

A presente descrição também cobre a utilização de enzimas como um componente de combinações de rações com outros componentes para administrar a animais.

COMBINAÇÃO COM OUTROS COMPONENTENTES

As enzimas codificadas pelas moléculas de ácido nucleico isoladas da presente invenção podem ser utilizadas em combinação com outros componentes ou veículos.

Os veículos adequados para enzimas de rações incluem trigo (grosseiramente moído). Além disso, existe uma variedade de

técnicas de encapsulamento incluindo aquelas baseadas em cobertura de gordura/cera, adicionar gomas de planta etc.

Os exemplos de outros componentes incluem um ou mais de: espessantes, agentes gelificantes, emulsionantes, aglutinantes, modificadores cristalinos, edulcorantes (incluindo edulcorantes artificiais), modificadores de reologia, estabilizantes, anti-oxidantes, corantes, enzimas, transportadores, veículos, excipientes, diluentes, agentes lubrificantes, agentes aromatizantes, matéria corante, agentes de suspensão, desintegrantes, aglutinantes de granulação etc. Estes outros componentes podem ser naturais. Estes outros componentes podem ser preparados por utilização de técnicas químicas e/ou enzimáticas.

Como aqui utilizado, o termo “espessante ou agente gelificante”, como aqui utilizado, refere-se a um produto que previne a separação por abrandamento ou prevenindo o movimento de partículas, gotas de líquidos imiscíveis, ar ou sólidos insolúveis.

O termo “estabilizante”, como aqui utilizado, é definido como um ingrediente ou combinação de ingredientes que conservam um produto (e. g., um produto alimentar) de alterações ao longo do tempo.

O termo “emulsionante”, como aqui utilizado, refere-se a um ingrediente (e. g., um ingrediente de produto alimentar) que previne a separação de emulsões.

Como aqui utilizado, o termo “aglutinante” refere-se a um ingrediente (e. g., um ingrediente alimentar) que aglutina o

produto em conjunto, através de uma reacção física ou química.

O termo “modificador cristalino”, como aqui utilizado, refere-se a um ingrediente (e. g., um ingrediente alimentar) que afecta a cristalização de gorduras ou água.

Os “transportadores” ou “veículos” significam materiais adequados para administração de compostos e incluem qualquer tipo de material conhecido na técnica, tal como, por exemplo, qualquer líquido, gel, solvente, diluente líquido, solubilizante ou semelhante, que é não-tóxico e que não interage com quaisquer componentes da composição num modo deletério.

Os exemplos de transportadores nutricionalmente aceitáveis incluem, por exemplo, grão, água, soluções salgadas, álcool, silicone, ceras, vaselina, óleos vegetais e semelhantes.

Os exemplos de excipientes incluem um ou mais de: celulose microcristalina e outras celulosas, lactose, citrato de sódio, carbonato de cálcio, fosfato de cálcio dibásico, glicina, amido, lactose e polietilenoglicóis de elevado peso molecular.

Os exemplos de desintegrantes incluem um ou mais de: amido (de um modo preferido, amido de milho, batata ou tapioca), glicolato de amido sódico, croscarmelose sódica e alguns silicatos complexos.

Os exemplos de aglutinantes de granulação incluem um ou mais de: polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), hidroxipropilcelulose (HPC), sacarose, maltose, gelatina e acácia.

Os exemplos de agentes lubrificantes incluem um ou mais de: estearato de magnésio, ácido esteárico, beenato de glicerilo e talco.

Os exemplos de diluentes incluem um ou mais de: água, etanol, propilenoglicol e glicerina, e suas combinações.

Os outros componentes podem ser utilizados simultaneamente (e. g., quando estão em misturas em conjunto ou mesmo quando são administrados por vias diferentes) ou sequencialmente (e. g., podem ser administrados por vias diferentes).

Como aqui utilizado o termo “componente adequado para consumo animal ou humano” significa um composto que é ou pode ser adicionado à composição da presente invenção como suplemento que pode ser de benefício nutricional, um substituto de fibra ou possui, de um modo geral, um efeito benéfico ao consumidor.

A título de exemplo, os componentes podem ser pré-bióticos tais como alginato, xantano, pectina, goma de alfarroba (LBG), inulina, goma de guar, galacto-oligossacárido de (GOS), fruti-oligossacárido (FOS), lactosacarose, oligossacárido de soja, palatinose, isomalto-oligossacárido, gluco-oligossacáridos de glucose e xilo-oligossacáridos.

SUBSTÂNCIA ALIMENTAR OU DE RAÇÃO

Os compostos podem ser utilizados como - ou na preparação de - uma substância alimentar ou de ração. Aqui, o termo “alimento” é utilizado num sentido vasto - e cobre alimentos e produtos alimentares para humanos bem alimentos para animais (i. e., uma

ração). O termo “ração” é utilizado com referência a produtos que são dados a animais na criação de gado. Num aspecto preferido, o alimento ou ração é para consumo por animais monogástricos, tais como porco, aves domésticas e peixe.

O alimento ou ração pode estar na forma de uma solução ou como sólido - dependendo da utilização e/ou do modo de aplicação e/ou do modo de administração.

INGREDIENTES E SUPLEMENTOS DE ALIMENTOS E RAÇÕES

Os compostos podem ser utilizados como ingrediente alimentar ou de rações.

Como aqui utilizado, o termo “ingrediente alimentar ou de rações” inclui uma formulação que é ou pode ser adicionada a alimentos ou produtos alimentares e inclui formulações que podem ser utilizadas a níveis baixos numa vasta variedade de produtos.

O ingrediente alimentar pode estar na forma de uma solução ou como sólido - dependendo da utilização e/ou do modo de aplicação e/ou do modo de administração.

Os compostos podem estar em - ou podem ser adicionados a - suplementos alimentares.

COMPOSIÇÕES ALIMENTARES E DE RAÇÕES - apenas para ilustração

As composições de rações para animais monogástricos, tipicamente, incluem composições compreendendo produtos vegetais

que contêm fitato. Essas composições incluem farinha de milho, farinha de soja, farinha de colza, farinha de sementes de algodão, milho, trigo, rações à base de cevada e sorgo.

As fitases aqui descritas podem estar em - ou podem ser adicionados a - substâncias e composições alimentares ou de rações.

A presente descrição também proporciona um método de preparação de um ingrediente ou suplemento alimentar ou de ração, o método compreendendo misturar fitases produzidas pelo processo da presente invenção ou a composição de acordo com a presente invenção com outro ingrediente alimentar. O método para preparar ou um ingrediente alimentar é também outro aspecto da presente invenção. Os métodos para preparar rações animais são expostos acima. A enzima pode ser adicionada também na forma de uma formulação sólida ou como aditivo de rações, tal como um pré-mistura. Uma forma sólida é, tipicamente, adicionada antes ou durante a etapa de mistura; e uma forma líquida é, tipicamente, adicionada após a etapa de aglomeração.

PRODUTO FARMACÊUTICO - apenas para ilustração

As fitases da presente descrição podem também ser utilizadas em preparações farmacêuticas ou para combinação em produtos alimentares, de modo a proporcionar algum efeito farmacêutico. Por exemplo, o documento EP 1389915 descreve a utilização de uma fitase numa comida ou bebida para aumentar a disponibilidade de Cálcio, Ferro e/ou Zinco da comida ou bebida para humanos.

Além disso, o documento EP 1392353 descreve um medicamento

ou suplemento nutricional contendo fitase, que é útil para aumentar a biodisponibilidade de bioelementos, e. g., cálcio e ferro, e para combater doenças carenciais.

Aqui, o termo “produto farmacêutico” é utilizado num sentido vasto e cobre produtos farmacêuticos e/ou nutracêuticos para humanos bem como produtos farmacêuticos e/ou nutracêuticos para animais (*i. e.*, aplicações veterinárias). Num aspecto preferido, o produto farmacêutico é para utilização humana e/ou para criação de animais.

O produto farmacêutico pode ser para fins terapêuticos - que podem ser de natureza curativa ou paliativa ou preventiva. O produto farmacêutico pode ainda ser para fins de diagnóstico.

Quando utilizado como - ou na preparação de - um produto farmacêutico, o produto e/ou compostos da presente invenção podem ser utilizados em conjunto com um ou mais de: um veículo farmaceuticamente aceitável, um diluente farmaceuticamente aceitável, um excipiente farmaceuticamente aceitável, um adjuvante farmaceuticamente aceitável, um ingrediente farmaceuticamente activo.

O produto farmacêutico pode estar na forma de uma solução ou como sólido - dependendo da utilização e/ou do modo de aplicação e/ou do modo de administração.

INGREDIENTE FARMACÊUTICO - apenas para ilustração

O produto e/ou os compostos da presente descrição podem ser utilizados como ingredientes farmacêuticos. Aqui, o produto e/ou

a composição da presente invenção pode ser o componente activo individual ou pode ser, pelo menos um, de uma variedade de (i. e. 2 ou mais) componentes activos.

O ingrediente farmacêutico pode estar na forma de uma solução ou como um sólido - dependendo da utilização e/ou do modo de aplicação e/ou do modo de administração.

O ingrediente farmacêutico pode estar na forma de um produto efervescente para melhorar as propriedades de dissolução do produto farmacêutico.

FORMAS - apenas para ilustração

O produto e/ou os compostos da presente descrição podem ser utilizados em qualquer forma adequada -quando isolados ou quando presentes numa composição. Do mesmo modo, as fitases produzidas de acordo com a presente descrição (i. e., ingredientes - tais como ingredientes alimentares, ingredientes alimentares funcionais ou ingredientes farmacêuticos) podem ser utilizados em qualquer forma adequada.

Os exemplos adequados de formas incluem um ou mais de: comprimidos, pílulas, cápsulas, óvulos, soluções ou suspensões, que podem conter agentes aromatizantes ou corantes, para libertação imediata, atrasada, modificada, sustentada, pulsada ou controlada de aplicações.

A título de exemplo, se o produto e/ou a composição são utilizados numa forma de comprimido - tal como para utilização como ingrediente funcional - os comprimidos podem também conter

um ou mais de: excipientes, desintegrantes, aglutinantes de granulação ou agentes lubrificantes.

Os exemplos de transportadores nutricionalmente aceitáveis para utilização na preparação de formas incluem, por exemplo, água, soluções salgadas, álcool, silicone, ceras, vaselina e semelhantes.

Os excipientes preferidos para as formas incluem lactose, amido, uma celulose, lactose ou polietilenoglicóis de elevado peso molecular.

Para suspensões aquosas e/ou elixires, compostos de clivagem de carotenóides podem ser combinados com vários agentes edulcorantes ou aromatizantes, matéria corante ou corantes, com emulsionante e/ou agentes de suspensão e com diluentes, tais como água, etanol, propilenoglicol e glicerina, e suas combinações

As formas podem também incluir cápsulas de gelatina; cápsulas de fibra, comprimidos de fibra etc.

TÉCNICAS METODOLÓGICAS GERAIS DE ADN RECOMBINANTE

A presente invenção emprega, a menos que indicado de outro modo, técnicas convencionais de química, biologia molecular, microbiologia, ADN recombinante e imunologia, que estão dentro das capacidades de um especialista na técnica. Essas técnicas são explicadas na literatura. Ver, por exemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch, e T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edição, Livros 1-3, Cold Spring

Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. et al., (1995 e suplementos periódicos; *Current Protocols in Molecular Biology*, ch. 9, 13, e 16, John Wiley & Sons, Nova Iorque, N. I.); B. Roe, J. Crabtree e A. Kahn, 1996, *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; M. J. Gait (Editor), 1984, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; e D. M. J. Lilley e J. E. Dahlberg, 1992, *Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology*, Academic Press.

EXEMPLOS

A invenção é agora ainda ilustrada nos seguintes exemplos não limitantes.

Exemplo 1. Ensaio de actividade de fitase.

Micro-l = microlitro

Os ensaios de fitase foram realizados em placas de microtitulação. A mistura de reacção (100 micro-l) continha: fitato 2 mM e CaCl_2 0,8 mM em tampão de acetato de sódio 200 mM, pH 3,5. A reacção prosseguiu durante 1 h a 37 °C, após esse tempo, o fosfato libertado foi medido por refinamento de um processo conhecido (Heinonen J.K., Lahti R.J. *Anal Biochem.* 113(2), 313-317 (1981)). Resumidamente, 200 micro-l de uma solução de AMM preparada de fresco (H_2SO_4 7,5 N, molibdato de amónio 15 mM e acetona - 1:1:2) foi adicionada a 100 micro-l de mistura de reacção em cada poço de placa de microtitulação. A absorvância a 390 nm foi medida, não antes de 10 min e não

depois de 30 min, após adição do reagente AMM. A quantidade de fosfato foi determinada construindo uma curva de calibração com soluções de fosfato de concentrações conhecidas. Para ensaiar a actividade de fitase a diferentes valores de pH foram utilizados os seguintes tampões (todos 200 mM): glicina/HCl entre pH 2,0 e 3,0, acetato de sódio/ácido acético entre pH 3,5 e 5,5, Tris/ácido maleico entre pH 6,0 e 7,5.

Exemplo 2. Produção da fitase de estirpe P1-29.

A estirpe bacteriana P1-29 foi originalmente isolada a partir de uma massa de material vegetal apodrecido recolhida no fundo de uma poça de água do Sul da Finlândia. A estirpe pode ser aerobicamente cultivada a 30 °C em muitos meios de cultura simples, e. g., LB (peptona 1%, extracto de levedura 0,5%, NaCl 1%, pH 7,4) ou meio de fosfato baixo PP1 (peptona 1%, extracto de carne 1%, extracto de bactéria 0,5%, CaCl_2 - 0,2 M. O meio é preparado ajustando o pH, a cerca de 11, com NaOH e em ebulição durante 10 min. O precipitado é removido por filtração, o pH é reajustado a 5,5 e o meio esterilizado por autoclavagem durante 15 min a 121 °C).

Após crescimento em meio PP1 líquido, verificou-se que a estirpe exhibe actividade de fitase a pH 3,5 e a 5,5 (ensaiado como descrito no Exemplo 1). A razão de actividades a 3,5 e 5,5 foi cerca de 1,3. A actividade foi, também, medida separadamente nas células e culturas sobrenadantes de P3-42. De acordo com estas medições, a maioria da actividade de fitase foi limitada à célula, com 10-20% de actividade encontrada em meio de cultura sobrenadante.

A estirpe está depositada no NCIMB sob o N° de acesso 41248.

Exemplo 3. Isolamento de ADN cromossómico da estirpe P1-29.

O ADN cromossómico foi preparado essencialmente pelo processo padrão (Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nova Iorque, 1996). Uma cultura de 250 mL cultivada, de um dia para o outro, a 30 °C em meio LB foi centrifugada a 10000 rpm durante 30 min, lavada em 20 mL de tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM pH 8 e ressuspensa em 10 mL de TES frio (tris-HCl 50 mM, EDTA 5 mM, glucose 15% pH 8). A lisozima foi adicionada a 10 mg/mL e a suspensão celular foi incubada, a 37 °C, durante 30-60 min até ocorrer lise, determinada pela diluição de 100 micro-l da mistura de reacção para 1 mL de SDS 1% e verificada para uma consistência "viscosa". Neste momento, a SDS e Proteínase K (Sigma) foram adicionadas à concentração final de 1% e 0,5 mg/mL, respectivamente. A mistura de reacção foi incubada durante 30 min a 56 °C seguida por adição de 2 mL de NaCl 5M e 1,4 mL de brometo de cetiltrimetilamónio 10% (Sigma). A incubação continuou durante 15 min 65 °C. A solução foi extraída uma vez com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e uma vez com fenol/clorofórmio. Após as extracções, a fase aquosa foi misturada com 0,6 vol de isopropanol, o precipitado de ADN recolhido por centrifugação (10000 rpm, 15 min), lavado com etanol 70%, seco a vácuo e ressuspensão em 2 mL de tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8,5 micro-g/mL. ARNse.

Exemplo 4. Identificação Taxonómica da estirpe bacteriana P1-29.

Um fragmento do gene rARN 16S da estirpe P1-29 foi amplificado pela reacção de polimerização em cadeia (PCR) com polimerase ADN Taq (Roche) utilizando os iniciadores; 536f (CAGCMGCCGCGGTAATWC) e 1392r (ACGGGCGGTGTGTRC), (Lane, D. J. *In nucleic acid techniques in bacterial systematics*, Stackbrandt, E. e Goodfellow, M. eds, John Wiley & Sons, Nova Iorque: pp 115-117 (1991)). Foi utilizado o seguinte programa: 1) etapa de desnaturação de ADN inicial de 5 min a 95 °C; 2) 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C, 1 min a 72 °C; 3) uma etapa de extensão final de 70 °C durante 10 min. Os produtos PCR, aproximadamente 900 pares de bases em tamanho, foram purificados por electroforese num gel de agarose 0,8% gel e extraídos a partir do gel utilizando um Kit de Purificação de Gel (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos PCR purificados foram sequenciados por Medprobe (Noruega) como serviço comercial. A área sequenciada é listada como SEQ ID N°: 1. Esta sequência foi comparada às sequências de ADN na base de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Os maiores emparelhamentos (688-689 por 691 nucleótidos, 99,6-99,7%) foram verificados com as sequências de gene ARN 16S a partir de várias estirpes de *Buttiauxella*, tais como *B. izardii* DSM 9397, *B. gaviniae* DSM 9393 e *B. noackiae* ATCC 51607T. Portanto, a estirpe P1-29 pode ser taxonomicamente classificada como *Buttiauxella* sp.

Exemplo 5. Clonagem do gene de fitase de *Buttiauxella* sp. P1-29.

O ADN cromossómico da *Buttiauxella* sp. P1-29 foi parcialmente digerido com endonuclease de restrição *Sau3A* e a digestão fraccionada em gel de agarose 1%. Os fragmentos de ADN de 3 a 5 kb foram isolados do gel utilizando um Kit de Purificação de gel (Qiagen) e ligados com braços de *bam*HI-digerido desfosforilado lambda-ZAP (Stratagene). As etapas subsequentes para construção de biblioteca seguiram as instruções de Stratagene's ZAP Express Predigested Vector/Gigapack Cloning Kit. A forma fago da biblioteca foi convertida para uma forma de plasmídeo pelo processo de “excisão de massa” como descrito pelo fabricante (Stratagene). O rastreio da biblioteca de plasmídeos foi feito por semelhança aos métodos anteriormente publicados para a detecção de actividade de fitase em placas de Petri (Howson e Davis. *Enzyme Microb. Technol.* 5, 377-382 (1983); Chen J.C. *Biotechnology techniques* 12 (10) 751-761 (1998); Riccio M.L. et al., *J. Appl. Microbiol.* 82, 177-185 (1997)). Vários clones de fitase-positivos foram isolados e purificados por sub-clonagem. Estes isolados foram cultivados em cultura líquida (meio LB a 30°C e 200 rpm durante cerca de 24 h) e a actividade de fitase foi medida (Exemplo 1) nas suspensões celulares resultantes. Um clone que possui a maior actividade de fitase (cerca de 1,2 U/mL a pH 3,5) foi seleccionado para caracterização subsequente. O plasmídeo de ADN foi isolado a partir deste clone, designado pBK(P1-29) e caracterizado por sequenciação parcial de ADN do inserto de ADN (o serviço de sequenciação foi obtido de Medprobe (Noruega)). A sequência compreendendo o gene de fitase é listada como SEQ ID N°: 2. A sequência deduzida da fitase *Buttiauxella* sp. P1-29 é listada como SEQ ID N°: 3. A comparação da SEQ ID N°: 3 com as

sequências em GenBank utilizando o serviço BLAST proporcionado por NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) identificou a fitase de *Obesumbacterium proteus* (GenBank acesso N° AAQ90419) como o homólogo conhecido mais próximo da fitase *Buttiauxella* sp. P1-29. No entanto, o nível de homologia é bastante baixo - apenas cerca de 74% de resíduos de aminoácido são idênticos em ambas as proteínas.

Exemplo 6. Amplificação e expressão génica de fitase de *Buttiauxella* sp. P1-29

O gene de fitase foi ampliado por PCR. O ADN cromossómico da estirpe *Buttiauxella* sp. P1-29 foi utilizado como modelo e oligonucleótidos o29-5 (GGAATTCATATGACGATCTCTGCGTTTAAC) e o29-3 (GGAATTCGGATCCTTA-CTGTAGCTGGCAGCCTG) como iniciadores. A amplificação foi realizada utilizando o kit Expand High Fidelity PCR System (Roche). Foi utilizado o seguinte programa: 1) desnaturação de ADN inicial durante 3 min a 94 °C; 2) 35 ciclos de 45 s a 94 °C, 45 s a 55 °C, 1 min a 68 °C, 1 min a 72 °C, 1 min a 74 °C; 3) uma etapa de extensão final de 10 min a 72 °C. O produto PCR resultante foi purificado por electroforese num gel de agarose 0,8% seguido por extracção de ADN a partir do gel utilizando um Kit de Purificação de Gel (Qiagen). O produto PCR purificado foi digerido com enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI* e isolado a partir da mistura de reacção pelo Kit de Purificação de PCR (Qiagen). O vector plasmídeo pET11a (Novagen) foi digerido com endonucleases de restrição *NdeI* e *BamHI*, desfosforilado utilizando fosfatase alcalina de camarão (Roche) e purificado por electroforese num gel de agarose 0,8%. A pista de plasmídeo de ADN linearizado foi excisada a partir do gel e purificada utilizando um Kit de Purificação de Gel (Qiagen). Os

dois fragmentos de ADN purificados foram ligados utilizando ligase ADN T4 (Roche). A reacção de ligação foi precipitada com etanol 70%, lavada com etanol e ressuspensa directamente para 50 micro-l de células electrocompetentes de *E. coli* XL1-Azul MRF'. A suspensão foi transferida para um cuvette de electroporação 0,1 cm (BioRad) e electroporada utilizando um conjunto de Gene Pulser Xcell (BioRad) a 1800 V, 25 micro-F e 200 Ohms. Imediatamente após a electroporação, foi adicionado 1 mL de meio LB, a suspensão celular foi transferida para um tubo plástico de 15 mL (Falcon) e incubada, a 37 °C, com agitação (200 rpm) durante 1 h. As células transformadas foram colocadas em placas LB contendo 100 micro-g/mL e incubadas, de um dia para o outro, a 37 °C. Cultivaram-se 24 transformantes em cultura líquida e as culturas utilizadas para ensaio de actividade de fitase e isolamento de ADN de plasmídeos. Foi seleccionado um clone que produz actividade de fitase muito elevada e que gera o padrão de restrição esperado do ADN de plasmídeo. O plasmídeo contido por este clone designado pET11(P1-29) foi utilizado para transformar a estirpe hospedeira de expressão BL21(DE3)pLisS (Novagen). A suspensão celular transformada foi agitada durante 1 h, a 37 °C, em LB contendo glucose 2% e inoculada para 50 mL de LB contendo ampicilina (100 micro-g/mL) e glucose (2%) e deixada a crescer, de um dia para o outro, a 30 °C com agitação (200 rpm). O OD da cultura resultante foi medido a 600 nm e a cultura foi utilizada para inocular 11 de LB + ampicilina (100 micro-g/mL) a um OD₆₀₀ de 0,04. O crescimento continuou, de um dia para o outro, a 30 °C. A actividade de fitase nessas culturas foi tipicamente 8-12 U/mL. Cerca de 40% de actividade de fitase foi secretada ao meio de cultura e o resto permaneceu associado com as células. Estas observações mostram que a fitase *Buttiauxella* P1-29 é secretada em *E.coli* um pouco mais eficientemente do que no seu

hospedeiro nativo. A actividade na cultura de uma estirpe controlo BL21(DE3)pLysS transformada com pET11 cultivada sob as mesmas condições foi abaixo de 0,05 U/mL.

Exemplo 7. Purificação da fitase recombinante de *Buttiauxella* P1-29.

A cultura de BL21(DE3)pLysS transformada com pET11(P1-29) foi centrifugada para remover as células bacterianas, concentrada utilizando um evaporador rotativo a cerca de 1/10 do volume original e dialisada contra água até a condutividade da solução diminuir abaixo de 250 micro-S/cm. O pH da solução foi ajustado a 8,0 com base tris e foi aplicada a uma coluna (3x20 cm) de DEAE Sepharose Fast Flow (Roche) equilibrada com tris-HCl 25 mM, pH 8,0. A coluna foi lavada com o tampão de equilíbrio a uma taxa de 3 mL/min durante 30 min seguida por eluição com três gradientes sucessivos de NaCl em 25 mM tris-HCl, pH 8,0: 0-50 mM, 50-150 mM e 150-500 mM. Cada um dos três gradientes foi programado durante 1 h com uma taxa constante de 3 mL/min. As fracções de 9 mL foram recolhidas e ensaiadas para actividade de fitase. Foi detectado um forte pico de actividade. A proteína na fracção de pico foi concentrada utilizando concentradores Centriplus (Amicon) e analisada SDS PAGE utilizando um gel a 12% e o sistema de tampão padrão Laemmli. Os resultados desta análise indicam que a preparação da fitase recombinante *Buttiauxella* P1-29 obtida por DEAE Sepharose contém um componente de proteína simples proeminente. As análises semi-quantitativas baseadas no varrimento da imagem digital do gel (Fig 1) indicam a pureza de cerca de 65%.

Exemplo 8. Perfil de pH da fitase recombinante de *Buttiauxella* P1-29

A dependência da actividade da fitase *Buttiauxella* P1-29 de (purificada de acordo com o Exemplo 7) um pH foi estudada em tampões e sob condições descritas no Exemplo 1. A enzima foi activa numa vasta área de pH (2-5,5) com um máximo a, aproximadamente, pH 4,5 e um "ombro" forte da curva a, aproximadamente, pH 3 (Fig 2).

Exemplo 9. Especificidade de substrato da fitase recombinante de *Buttiauxella* P1-29.

As fracções de fosfatos de inositol contendo três, quarto ou cinco fosfatos por resíduo de inositol foram isoladas por cromatografia de troca iónica a partir de um hidrolisado parcial de ácido fítico tratado com fitase de fungos (Natuphos). A produção e purificação destas preparações foi um serviço comercial de BioChemis Ltd (São Petersburgo, Rússia). A contaminação de cada fracção com fosfatos de inositol possuindo um grau diferente de fosforilação foi menos de 5% como avaliado por HPLC (Sandberg A.S., Ahderinne R. *J. Food Sci.* 51 (3), 547-550). Foram utilizadas frutose comercial 1,6-difosfato e frutose 6-fosfato (Sigma) como substratos modelo utilizados para estimar a especificidade da fitase *Buttiauxella* P1-29 para substratos di- e monofosfato. A actividade da fitase *Buttiauxella* purificada de acordo com o Exemplo 7 com substratos diferentes foi medida por ensaio padrão (Exemplo 1) a pH 3,5 utilizando concentração de substratos 2 mM na mistura de reacção final. Os resultados (Fig 3) indicam que aquela enzima possui especificidade de substrato extremamente vasta. A sua actividade

com penta-, tetra- e trifosfatos foi essencialmente igual ou um pouco maior do que a actividade com ácido fítico como substrato. Mesmo a frutose 1,6-difosfato - um substrato pobre para a maioria das fitases, foi mais eficientemente hidrolisada por fitase *Buttiauxella* sp. (em particular, a fitase derivada de P1-29). A hidrólise de frutose 6-fosfato foi também detectável embora muito menos eficiente do que a hidrólise dos outros substratos testados.

Exemplo 10. Actividade específica da fitase recombinante de *Buttiauxella* P1-29.

A actividade específica da fitase *Buttiauxella* P1-29 foi estimada utilizando a preparação purificada de acordo com o Exemplo 7. A actividade de fitase foi medida a pH 3,5 de acordo com o Exemplo 1. A concentração de fitase foi calculada medindo a concentração de proteína total com o kit BCA Protein Assay (Pierce) e corrigindo-a pelo teor de fitase estimado por SDS PAGE (Exemplo 7). De acordo com estas medições, a actividade específica da fitase recombinante de *Buttiauxella* P1-29 é cerca de 300 U/mg a 37 °C.

Exemplo 11. Geração e caracterização de variantes fitase.

As variantes fitase foram construídas por mutagénese da sequência nucleotídica SEQ ID N°: 2 utilizando métodos de mutagénese como listados acima, tais como os métodos divulgados em Morinaga et al. (*Biotechnology* (1984) 2, p 646-649) ou em Nelson e Long (*Analytical Biochemistry* (1989), 180, p 147-151) ou o protocolo *Error Threshold Mutagenesis* descrito no documento

WO 92/18645. Outro método adequado para PCR mutagénica é divulgado por Cadwell e Joyce (*PCR Methods Appl.* 3(1994), 136-140).

As variantes de enzima fitase foram caracterizadas após expressão heteróloga em um ou mais dos seguintes hospedeiros de expressão: *Escherichia coli* K12; *Bacillus subtilis*; *Saccharomyces cerevisiae*.

Foram derivadas as variantes fitase que diferem em uma ou mais posições de aminoácidos a partir de SEQ ID N°: 3, incluindo duas posições, três posições, quatro posições, cinco posições, seis posições, sete posições, oito posições, nove posições, dez posições, onze posições, doze posições. Foram realizados, onde apropriado, ciclos iterativos de mutagénese, como aqui descrito.

Caracterização de variantes fitase

1. Termoestabilidade

A termoestabilidade dessas variantes foi caracterizada pela temperatura de inactivação da enzima. A temperatura de inactivação foi determinada medindo a actividade residual da enzima fitase após incubação, durante 10 min, a temperaturas diferentes e subsequente arrefecimento à temperatura ambiente. A temperatura de inactivação é a temperatura a que a actividade residual é 50%, comparada à actividade residual após incubação para a mesma duração sob as mesmas condições à temperatura ambiente. Onde apropriado são feitas interpolações e extrapolações a partir dos dados de actividade medidos, de modo a determinar a temperatura correspondente a 50% de actividade

residual. As diferenças de termoestabilidade em °C foram calculadas por subtração das temperaturas de inativação de duas enzimas.

A tabela 1 lista as diferenças de termoestabilidade para diferentes variantes:

TABELA 1:

Diferenças de termoestabilidade (TD) das variantes derivadas da fitase progenitora apresentada em SEQ ID N°: 3.	
Variante	T.D.
K59E	2,5
T167V	2,5
K240T	2,1
T167I	3,0
K240E	3,3
D244C	4,2
Q289Y	4,4
T209K	1,8
F197S	1,0
D125E/H193R	1,5
A294E/N303K	3,5
T167I/K240T	4,1
D223E/K240E/N351D	2,7
T167I/K240T/A294E/N303K	6,1
T167I/K240E/A242S/A294E/N303K	8,2
A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A294E/N303K	11,5
A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A242S/S281L/Q289Y/A294E/N303K	15,2

(continuação)

Diferenças de termoestabilidade (TD) das variantes derivadas da fitase progenitora apresentada em SEQ ID N°: 3.	
Variante	T.D.
A122T/D125E/H193R/F197S/T209K/A211P/S221N/G225A/K240E/A294E/N303K	12,0
D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K	16,5
A122T/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K/I336F	17,7
N70Y/D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K	20,2

2. Outras características

Outras características foram também melhoradas.

A termoestabilidade, actividade específica e estabilidade de pepsina de variantes seleccionadas foram comparadas utilizando ensaios como descrito acima. A estabilidade de pepsina dessas variantes foi caracterizada por actividades residuais medidas a pH 3,5, 37 °C após incubação de pepsina comparada às condições controlo (actividade residual = actividade após incubação de pepsina/actividade após incubação sob condições controlo). A incubação de pepsina foi realizada durante 2 horas a pH 2,0, pepsina 0,25 mg/mL, CaCl₂ 1 mM e BSA 5 mg/mL a 37° C. As condições de controlo foram 2 horas a pH 5,0 CaCl₂ 1 mM e BSA 5 mg/mL a 37 °C.

A tabela 2 apresenta propriedades de variantes seleccionadas

(derivadas de e comparadas a fitase, em peso, de acordo com SEQ ID N°: 3).

TABELA 2:

Estabilidade de pepsina para variantes derivadas de fitase progenitora apresentada em SEQ ID N°: 3.	
Variante	Estabilidade de pepsina [% de actividade residual]
A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A294E/N303K	63
A22T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A242S/S281L/Q289Y/A294E/N303K	72
A122T/D125E/H193R/F197S/T209K/A211P/S221N/G225A/K240E/A294E/N303K	34
D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K	62
A122T/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K/I336F	61
N70Y/D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/Q289H/A294E/N303K	77

TABELA 3:

Actividade específica para uma variante derivada da fitase progenitora apresentada em SEQ ID N°: 3:	
Variante	Actividade específica [% de actividade em peso a pH 4,0]
A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A242S/S281L/Q289Y/A294E/N303K	115

A presente divulgação também descreve nos seguintes parágrafos numerados:

1. Um polipéptido compreendendo a sequência de aminoácidos correspondente a uma fitase *Buttiauxella sp.*, ou uma forma modificada, um polipéptido homólogo, uma variante, um equivalente funcional ou um seu fragmento eficaz.
2. Um polipéptido como descrito no parágrafo 1 compreendendo a sequência de aminoácidos como apresentada em SEQ ID N°: 3 ou uma sequência possuindo, pelo menos, 75% de identidade (homologia), de um modo preferido, possui, pelo menos, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade (homologia) a esta ou um seu fragmento funcional.
3. Um polipéptido, de acordo com os parágrafos 1 ou 2, em que o referido polipéptido é isolado e/ou purificado.
4. Um polipéptido, de acordo com os parágrafos 1 a 3, em que o referido polipéptido apresenta actividade de fitase.
5. Um polipéptido, de acordo com os parágrafos 1 a 4,

caracterizado por ser obtido a partir, de um modo preferido derivado, da estirpe *Buttiauxella sp.* Pl-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248.

6. Um polipéptido, de acordo com os parágrafos 4 ou 5 ou seu equivalente funcional caracterizado por a referida fitase possuir uma actividade específica de, pelo menos, 100, de um modo mais preferido, pelo menos, 200, de um modo muito preferido, pelo menos, 300 U/mg, em que a referida actividade específica é determinada por incubação da referida fitase numa solução contendo fitato 2 mM, CaCl_2 0,8 mM em tampão de acetato de sódio 200 mM a pH 4,5, a uma temperatura de 37 °C.
7. Um polipéptido, de acordo com os parágrafos 4 a 6 ou seu equivalente funcional caracterizado por a referida fitase possuir um máximo de actividade a, aproximadamente, pH 3 a 6, de um modo preferido, a cerca de pH 4 a 5, de um modo muito preferido, a cerca de pH 4,5, em que a referida actividade é determinada por incubação da referida fitase numa solução contendo fitato 2 mM, CaCl_2 0,8 mM em tampão de acetato de sódio 200 mM a uma temperatura de 37 °C.
8. Um polipéptido como descrito em qualquer dos parágrafos 1 a 7, que compreende mutações em, pelo menos, uma das seguintes posições (numeradas de acordo com a numeração em SEQ ID N°: 3): 59, 70, 122, 125, 167, 193, 197, 204, 209, 211, 221, 223, 225, 240, 242, 244, 268, 281, 289, 294, 303, 336 ou 351.
9. Um polipéptido como descrito no parágrafo 8, em que a referida fitase compreende uma ou mais das seguintes

mutações:

K 59 A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W
ou Y;

ou

T 70 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W
ou Y;

ou

A 122 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W
ou Y;

ou

D 125 A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W
ou Y;

ou

T 167 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W
ou Y;

ou

H 193 A, C, D, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W
ou Y;

ou

F 197 A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W
ou Y;

ou

T 204 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W
ou Y;

ou

T 209 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W
ou Y;

ou

A 211 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W
ou Y;

ou

G 221 A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W
ou Y;

ou

I 223 A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W
ou Y;

ou

S 225 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W
ou Y;

ou

K 240 A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W
ou Y;

ou

A 242 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W
ou Y;

ou

D 244 A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W
ou Y;

ou

A 268 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W
ou Y;

ou

L 281 A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W
ou Y;

ou

Q 289 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W
ou Y;

ou

A 294 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W
ou Y;

ou

N 303 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W
ou Y;

ou

I 336 A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W
ou Y;

ou

N 351 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W
ou Y.

10. Um polipéptido/enzima fitase como descrito no parágrafo 8 ou 9, compreendendo, pelo menos, uma mutação seleccionada do grupo consistindo de: K59E; T167V; K240T; T167I; K240E; D244C; Q289Y; T209K ou F197S.
11. Um polipéptido/enzima fitase como descrito no parágrafo 8 a 10, compreendendo uma combinação de mutações seleccionadas do grupo consistindo de:

D125E/H193R; ou

A294E/N303K; ou

T167I/K240T; ou

D223E/K240E/N351D; ou

T167I/K240T/A294E/N303K; ou

T167I/K240E/A242S/A294E/N303K; ou

A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A294E/N303K; ou

A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A242S/S281L/Q289Y/

A294E/N303K; ou

A122T/D125E/H193R/F197S/T209K/A211P/S221N/G225A/K240E/

A294E/N303K; ou

D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/

Q289H/A294E/N303K; ou

A122T/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/

Q289H/A294E/N303K/I336F; ou

N70Y/D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/

A268V/Q289H/A294E/N303K.

12. Um polipéptido/enzima fitase como descrito no parágrafo 8 a 11, em que o referido polipéptido ou enzima fitase isolado é uma variante de enzima fitase melhorada, que comparada à enzima fitase progenitora possui propriedade/propriedades melhorada(s) seleccionada(s) de:

- i. maior estabilidade térmica e/ou
- ii. actividade específica e/ou
- iii. estabilidade proteolítica

13. Uma molécula de ácido nucleico isolada seleccionada de

- i) uma molécula de ácido nucleico isolada que codifica para a fitase como descrita em qualquer dos parágrafos 1 a 12.
- ii) um ácido nucleico que hibrida a um ácido nucleico que codifica para o polipéptido de SEQ ID N°: 3 ou seu homólogo, sob condições de restringência médias, de um modo preferido, condições de restringência alta ou muito alta.
- iii) uma molécula de ácido nucleico isolada compreendendo a sequência como exposta em SEQ ID N°: 2 ou seu homólogo.
- iv) um ácido nucleico que hibrida a SEQ ID N°: 2 ou seu complemento, sob condições de restringência médias, de um modo preferido, condições de restringência alta ou muito alta.

14. Uma molécula de ácido nucleico isolada de acordo com o parágrafo 13 que codifica um polipéptido compreendendo a

sequência de aminoácidos como apresentada em SEQ ID N°: 3 ou uma sequência possuindo, pelo menos, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 99% de identidade (homologia) a esta sequência ou um seu fragmento eficaz.

15. Uma molécula de ácido nucleico isolada de acordo com os parágrafos 13 ou 14 compreendendo uma sequência nucleotídica que é a mesma, ou é complementar a, ou contém quaisquer substituições de codão adequadas para qualquer da SEQ ID N°: 2 ou compreende uma sequência que possui, pelo menos, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou 99% de homologia de sequência com SEQ ID N°: 2.
16. Uma molécula de ácido nucleico isolada de acordo com os parágrafos 13 a 15, em que a referida molécula de ácido nucleico codifica o polipéptido dos parágrafos 8 a 12.
17. Um plasmídeo ou sistema de vectores compreendendo um nucleótido de acordo com os parágrafos 13 a 16.
18. Um plasmídeo ou sistema de vectores de acordo com o parágrafo 17, em que o referido plasmídeo ou sistema de vectores é um vector de expressão de qualquer das enzimas de acordo com os parágrafos 1 a 12 e/ou compreende polinucleótidos de acordo com os parágrafos 13 a 16, num microrganismo.
19. Uma célula hospedeira transformada ou transfectada com um plasmídeo ou sistema de vectores como descrito em qualquer dos parágrafos 17 ou 18.
20. Uma célula hospedeira como descrita no parágrafo 19 que

compreende uma fitase que compreende uma sequência de aminoácidos ou seu fragmento funcional, como exposto em SEQ ID N°: 3 ou uma sequência polipeptídica homóloga que é, pelo menos, 75% homóloga a esta.

21. Uma célula hospedeira como descrita no parágrafo 19 ou 20, em que a referida célula hospedeira é derivada de um microrganismo, incluindo bactérias, tais como *B. subtilis*, *E. coli* e fungos, incluindo leveduras, tais como *H. polymorpha*, *S. pombe*, *S. cerevisiae* e fungos filamentosos, tais como *Trichoderma spp.* e *Aspergillus spp.*, tais como *A. oryzae*.
22. Uma célula hospedeira como descrita no parágrafo 21, em que o referido microrganismo é uma célula bacteriana procariótica, de um modo preferido, *E. coli*.
23. Uma célula bacteriana de estirpe *Buttiauxella sp.* Pl-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248.
24. Um método de produção de um polipéptido compreendendo expressar uma sequência de aminoácidos de acordo com os parágrafos 1 a 12 e/ou expressar os polinucleótidos de acordo com os parágrafos 13 a 16, numa célula hospedeira e separar a referida fitase do meio de cultura de célula hospedeira.
25. Um método para produção de alimento ou ração animal compreendendo uma etapa de pulverização de um polipéptido, como descrito em qualquer dos parágrafos 1 a 12, em forma líquida, no referido alimento ou ração animal.

26. Um método para produção de alimento ou ração animal compreendendo uma etapa de mistura do polipéptido, como descrito em qualquer dos parágrafos 1 a 12, como um produto seco com o referido alimento ou ração animal.
27. Utilização de uma fitase, como descrita em qualquer dos parágrafos 1 a 12, no alimento ou ração animal.
28. Uma composição alimentar ou de ração animal compreendendo i) uma fitase como descrita em qualquer dos parágrafos 1 a 12 e/ou ii) uma ração animal produzida pelo método de acordo com os parágrafos 25 ou 26.
29. Um método de preparação de uma variante de enzima fitase, o referido método compreende as seguintes etapas sequenciais:
- a) Seleccionar, pelo menos, uma enzima fitase progenitora, em que a, pelo menos uma, enzima fitase progenitora é seleccionada i) dos polipéptidos de acordo com os parágrafos 1-12 e/ou ii), pelo menos, uma variante de enzima fitase;
 - b) Gerar, pelo menos, uma variante fitase introduzindo, pelo menos, uma alteração da referida enzima fitase progenitora que é uma inserção, uma remoção ou uma substituição ou sua combinação, de um resíduo de aminoácido na referida enzima fitase progenitora para obter, pelo menos, uma variante de enzima fitase;
 - c) Rastrear para a referida, pelo menos uma, variante de enzima fitase para identificar uma variante de enzima fitase melhorada, que comparada à enzima fitase

progenitora possui propriedade/propriedades
melhorada(s) seleccionada(s) de:

- i. maior estabilidade térmica e/ou
- ii. actividade específica e/ou
- iii. estabilidade proteolítica

d) Preparar a referida variante de enzima fitase
melhorada, de um modo preferido, para produzir uma
variante de enzima fitase isolada e/ou purificada.

30. Um método de acordo com o parágrafo 29, em que durante a
etapa b) uma população de variantes de enzima fitase é
gerada e na etapa c), pelo menos, é rastreada uma proporção
da referida população de variantes de enzima fitase.
31. Um método de acordo com os parágrafos 29 ou 30, em que a
etapa a) compreende submeter uma sequência nucleotídica de
acordo com os parágrafos 11 a 13 que codifica uma enzima
fitase progenitora a mutagénese e a etapa b) compreende
expressar a sequência nucleotídica mutada obtida na etapa
(a) numa célula hospedeira e a etapa c) compreende rastrear
as células hospedeiras ou seu(s) extracto(s) para uma
variante de enzima fitase melhorada com a(s) referida(a)
propriedade/propriedades melhorada(s).
32. Um método de acordo com os parágrafos 29 a 31 que, após a
etapa c) e, opcionalmente, d), compreende ainda, pelo
menos, um ciclo subsequente de etapas repetidas a) a c) e,
opcionalmente, d) em que, de um modo preferido, no(s)
referido(s) ciclo(s) subsequente(s), é seleccionada a, pelo
menos uma, enzima fitase progenitora da etapa a) da

referida, pelo menos uma, variante de enzima fitase e/ou uma variante de enzima fitase preparada de acordo com o método dos parágrafos 29 a 31.

33. Um método de acordo com os parágrafos 29 a 32, em que a etapa c) compreende rastrear células hospedeiras que expressam uma variante de enzima fitase melhorada que comparada i) à referida enzima fitase progenitora e/ou ii) a um polipéptido compreendendo a SEQ ID N°: 3, possui uma diferença de estabilidade térmica de, pelo menos, 2,5.
34. Um método de acordo com os parágrafos 29 a 33, em que a etapa c) compreende rastrear células hospedeiras que expressam uma variante de enzima fitase melhorada que comparada i) à referida enzima fitase progenitora e/ou ii) a um polipéptido compreendendo a SEQ ID N°: 3, possui estabilidade de pepsina de, pelo menos, 30.
35. Um método de acordo com os parágrafos 29 a 34, em que a etapa c) compreende rastrear células hospedeiras que expressam uma variante de enzima fitase melhorada que comparada i) à referida enzima fitase progenitora e/ou ii) a um polipéptido compreendendo a SEQ ID N°: 3, possui uma razão de actividade específica, quando comparada à fitase codificada pela SEQ ID N°: 3 de, pelo menos, 110.
36. Uma variante fitase melhorada preparada de acordo com o método dos parágrafos 29 a 35.
37. Uma construção de ácido polinucleico, de um modo preferido, uma construção de ADN compreendendo uma sequência de ácidos polinucleicos que codificam uma variante de enzima fitase

melhorada de acordo com qualquer dos parágrafos 16 ou parágrafo 36.

38. Um vector de expressão recombinante que compreende uma construção de ácido polinucleico de acordo com o parágrafo 37.
39. Uma célula hospedeira que é transformada com um ácido polinucleico de ADN de acordo com o parágrafo 37 e/ou um vector de acordo com o parágrafo 38.
40. Um método para produção de uma variante de enzima fitase melhorada compreendendo cultivar a célula hospedeira de acordo com o parágrafo 39 sob condições que permitem a expressão da referida variante de enzima fitase melhorada.
41. Uma composição de ração ou alimento compreendendo, pelo menos, uma variante de enzima fitase melhorada de qualquer dos parágrafos 8 a 12 ou 36, ou célula hospedeira do parágrafo 38, em que a referida composição de ração ou alimento é, de um modo preferido, preparada de acordo com os métodos dos parágrafos 25 ou 26.

SEQ ID N°: 1

**ACTACGACGCACTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCT
TTGTATGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGA
TGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCT
TTGAGTTCCCGGCCGAACCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGT
TGCGGGACTTAACCCAACATTTACAAACACGAGCTGACGACAGCCATGCA
GCACCTGTCTCACAGTTCCCGAAGGCACTAAGGCATCTCTGCCAAATTCT**

GTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAAACCA
CATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACC
TTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTGACTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGC
CACTCCTCAAGGGAACAACCTCCAAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACT
ACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTC
AGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCTTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCT
ACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTA
GCCTGCCAGTTTCGAATGCAGTTCACAGGTTGAGCCCCGGG

SEQ ID N°: 2

TTTCACATAGCAAACAACAACGAGACGAACTCGACGTTACCGCTTTGCTT
CTGGAGTATATTTATCAGACTCAAACACCCCAAAGAAAAGAGGCTGTAA
TGACGATCTCTGCGTTTAACCGCAAAAAACTGACGCTTCACCCTGGTCTG
TTCGTAGCACTGAGCGCCATATTTTCATTAGGCTCTACGGCCTATGCCAA
CGACACTCCCGCTTCAGGCTACCAGGTTGAGAAAGTGGTAATACTCAGCC
GCCACGGGGTGCGAGCACCAACCAAAATGACACAGACCATGCGCGACGTA
ACACCTAATACCTGGCCCGAATGGCCAGTAAAATTGGGTATATCACGCC
ACGCGGTGAGCATCTGATTAGCCTGATGGGCGGGTTTTATCGCCAGAAGT
TTCAACAACAGGGCATTTTATCGCAGGGCAGTTGCCCCACACCAAACCTCA
ATTTATGTCTGGGCAGACGTTGATCAGCGCACGCTTAAAACTGGCGAAGC
TTTCCTGGCAGGGCTTGCTCCGGAATGTCATTTAACTATTCACCACCAGC
AGGACATCAAAAAGCCGATCCGCTGTTCCATCCGGTGAAAGCGGGCACC
TGTTCAATGGATAAACTCAGGTCCAACAGGCCGTTGAAAAGAAGCTCA
AACCCCCATTGATAATCTGAATCAGCACTATATTCCTTTCTGGCCTTGA
TGAATACGACCCTCAACTTTTCGACGTCGGCCTGGTGTGAGAAACACAGC
GCGGATAAAAGCTGTGATTTAGGGCTATCCATGCCGAGCAAGCTGTCGAT
AAAAGATAATGGCAACAAGTCGCTCTCGACGGGGCCATTGGCCTTTCTGT
CTACGCTTGCTGAAATTTTCCTGCTGGAATATGCGCAAGGGATGCCGCAA
GCGGCGTGGGGGAATATTCATTCAGAGCAAGAGTGGGCGTCGCTACTGAA
ACTGCATAACGTCCAGTTTGATTTGATGGCACGCACGCCTTATATCGCCA

GACATAACGGCACGCCTTTATTGCAGGCCATCAGCAACGCGCTGAACCCG
AATGCCACCGAAAGCAAACCTGCCTGATATCTCACCTGACAATAAGATCCT
GTTTATTGCCGGACACGATACCAATATTGCCAATATCGCAGGCATGCTCA
ACATGCGCTGGACGCTACCTGGGCAACCCGATAACACCCCTCCGGGCGGC
GCTTTAGTCTTTGAGCGTTTGGCCGATAAGTCAGGGAAACAATATGTTAG
CGTGAGCATGGTGTATCAGACTCTCGAGCAGTTGCGCTCCCAAACACCAC
TTAGCCTTAATCAACCTGCGGGAAGCGTACAGCTAAAAATTCCTGGCTGT
AACGATCAGACGGCTGAAGGATACTGCCCCTGTGACGTTCACTCGCGT
GGTTAGCCAAAGCGTGGAACCAGGCTGCCAGCTACAGTAAATATCAGACA
AAAAAATGCCGCTCGCGATTAAGCGAACGGCATTACTTCCTAGCTTCCC
AGCTCGGATTAGCATGGCGAGAGCCGAAAAACTT

SEQ ID N°: 3

MTISAFNRKKLTLHPGLFVALSAIFSLGSTAYANDTPASGYQVEKVVILS
RHGVRAPTKMTQTMRDVTPNTWPEWPKLGYITPRGEHLISLMGGFYRQK
FQQQGILSQGSCPTPNSIYVWADVQRTLKTGEAFLAGLAPECHLTIHHQ
QDIKKADPLFHPVKAGTCSMDKTQVQQAVEKEAQTPIDNLNQHYIPFLAL
MNTTLNFSSTAWCQKHSADKSCDLGLSMP SKLSIKDNGNKVALDGAIGLS
STLAEIFLLEYAQGMPPQAAWGNHSEQEWASLLKLHNVQFDLMARTPYIA
RHNGTPLLQAI SNALNP NATESKL PDISP DNKILFIAGHDTN IANIAGML
NMRWTLPGQPDNTPPGGALVFERLADKSGKQYVSVSMVYQTLQRLSQTP
LSLNQPAAGSVQLKIPGCNDQTAEGYCPLSTFTTRVVSQSVEPGCQLQ

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> DANISCO A/S

<120> ENZIMAS

<130> P021161WO

<140> PCT/IB2005/003376

<141> 2005-10-17

<150> GB 0423139.5

<151> 2004-10-18

<160> 7

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1

<211> 691

<212> ADN

<213> *Buttiauxella*

<400> 1

```
actacgacgc actttatgag gtccgcttgc tctcgcgagg tcgcttctct ttgtatgcgc      60
cattgtagca cgtgtgtagc cctactcgta agggccatga tgacttgacg tcatccccac      120
cttcctccag tttatcactg gcagtctcct ttgagttccc ggccgaaccg ctggcaacaa      180
aggataaggg ttgcgctcgt tgcgggactt aacccaacat ttcacaacac gagctgacga      240
cagccatgca gcacctgtct cacagttccc gaaggcacta aggcattctt gccaaattct      300
gtggatgtca agagtaggta aggttcttcg cgttgcatcg aattaaacca catgctccac      360
cgcttgtagc ggcccccgtc aattcatttg agttttaacc ttgcggccgt actccccagg      420
cggtcgactt aacgcgttag ctccggaagc cactcctcaa gggaacaacc tccaagtcga      480
catcgtttac ggcgtggact accaggggat ctaatcctgt ttgctcccca cgctttcgca      540
cctgagcgtc agtctttgtc cagggggccg ccttcgccac cgggtattctt ccagatctct      600
acgcatttca ccgctacacc tggaattcta cccccctcta caagactcta gcctgccagt      660
ttcgaatgca gttcccaggt tgagcccggg g                                691
```

<210> 2

<211> 1534

<212> ADN

<213> *Buttiauxella*

<400> 2

tttcacatag caaacaacaa cgagacgaac tcgacgttac cgctttgctt ctggagtata	60
tttatcagac tcaaacaccc caaagaaaag aggctgtaaa tgacgatctc tgcgtttaac	120
cgcaaaaaac tgacgcttca ccctggtctg ttcgtagcac tgagcgccat attttcatta	180
ggctctacgg cctatgccaa cgacactccc gcttcagggt accagggtga gaaagtggta	240
atactcagcc gccacggggt gcgagcacca accaaaatga cacagaccat gcgcgacgta	300
acacctaata cctggcccga atggccagta aaattggggt atatcacgcc acgcggtgag	360
catctgatta gcctgatggg cgggttttat cgccagaagt ttcaacaaca gggcatttta	420
tcgcagggca gttgccccac accaaactca atttatgtct gggcagacgt tgatcagcgc	480
acgcttaaaa ctggcgaagc tttcctggca gggcttgctc cggaatgtca tttactatt	540
caccaccagc aggacatcaa aaaagccgat ccgctgttcc atccggtgaa agcgggcacc	600
tgttcaatgg ataaaactca ggtccaacag gccgttgaaa aagaagctca aacccccatt	660
gataatctga atcagcacta tattcccttt ctggccttga tgaatacgac cctcaacttt	720
tcgacgtcgg cctggtgtca gaaacacagc gcggataaaa gctgtgattt agggctatcc	780
atgccgagca agctgtcgat aaaagataat ggcaacaaag tcgctctcga cggggccatt	840
ggcctttcgt ctacgcttgc tgaaattttc ctgctggaat atgcgcaagg gatgccgcaa	900
gcggcgtggg ggaatattca ttcagagcaa gagtgggcgt cgctactgaa actgcataac	960
gtccagtttg atttgatggc acgcacgcct tatatcgcca gacataacgg cagccttta	1020
ttgcaggcca tcagcaacgc gctgaaccgc aatgccaccg aaagcaaact gcctgatatc	1080
tcacctgaca ataagatcct gtttattgcc ggacacgata ccaatattgc caatatcgca	1140
ggcatgctca acatgcgctg gacgctacct gggcaaccgc ataacacccc tccgggcggc	1200
gctttagtct ttgagcgttt ggccgataag tcagggaac aatatgttag cgtgagcatg	1260
gtgtatcaga ctctcgagca gttgcgctcc caaacaccac ttagccttaa tcaacctgcg	1320
ggaagcgtag agctaaaaat tcctggctgt aacgatcaga cggctgaagg atactgccc	1380
ctgtcgacgt tcactcgctg ggtagccaa agcgtggaac caggctgcca gctacagtaa	1440
atatcagaca aaaaaaatgc cgctcgcgat taagcgaacg gcattacttc ctagcttccc	1500
agctcggatt agcatggcga gagccgaaaa actt	1534

<210> 3
<211> 446
<212> PRT
<213> *Buttiauxella*

<220>
<221> LOCAL
<222> (59)..(59)
<223> Qualquer aminoácido.

<220>
<221> LOCAL
<222> (70)..(70)
<223> Qualquer aminoácido.

<220>
<221> LOCAL
<222> (122)..(122)
<223> Qualquer aminoácido.

<220>
<221> LOCAL
<222> (125)..(125)
<223> Qualquer aminoácido.

<220>
<221> LOCAL
<222> (167)..(167)
<223> Qualquer aminoácido.

<220>
<221> LOCAL
<222> (193)..(193)
<223> Qualquer aminoácido.

<220>
<221> LOCAL
<222> (197)..(197)
<223> Qualquer aminoácido.

<220>
<221> LOCAL
<222> (204)..(204)
<223> Qualquer aminoácido.

<220>
<221> LOCAL
<222> (209)..(209)
<223> Qualquer aminoácido.

<220>
<221> LOCAL
<222> (211)..(211)
<223> Qualquer aminoácido.

<220>
<221> LOCAL
<222> (221)..(221)
<223> Qualquer aminoácido.

<220>
<221> LOCAL

<222> (223)..(223)
<223> Qualquer aminoácido.

<220>
<221> LOCAL
<222> (225)..(225)
<223> Qualquer aminoácido.

<220>
<221> LOCAL
<222> (240)..(240)
<223> Qualquer aminoácido.

<220>
<221> LOCAL
<222> (242)..(242)
<223> Qualquer aminoácido.

<220>
<221> LOCAL
<222> (244)..(244)
<223> Qualquer aminoácido.

<220>
<221> LOCAL
<222> (268)..(268)
<223> Qualquer aminoácido.

<220>
<221> LOCAL
<222> (281)..(281)
<223> Qualquer aminoácido.

<220>
<221> LOCAL
<222> (289)..(289)
<223> Qualquer aminoácido.

<220>
<221> LOCAL
<222> (294)..(294)
<223> Qualquer aminoácido.

<220>
<221> LOCAL
<222> (303)..(303)
<223> Qualquer aminoácido.

<220>
<221> LOCAL
<222> (336)..(336)
<223> Qualquer aminoácido.

<220>
<221> LOCAL
<222> (351)..(351)
<223> Qualquer aminoácido.

<400> 3

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

195					200					205					
Thr	Ser	Ala	Trp	Cys	Gln	Lys	His	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Cys	Asp	Leu
	210					215					220				
Gly	Leu	Ser	Met	Pro	Ser	Lys	Leu	Ser	Ile	Lys	Asp	Asn	Gly	Asn	Lys
225					230					235					240
Val	Ala	Leu	Asp	Gly	Ala	Ile	Gly	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Ala	Glu	Ile
				245					250					255	
Phe	Leu	Leu	Glu	Tyr	Ala	Gln	Gly	Met	Pro	Gln	Ala	Ala	Trp	Gly	Asn
			260					265					270		
Ile	His	Ser	Glu	Gln	Glu	Trp	Ala	Ser	Leu	Leu	Lys	Leu	His	Asn	Val
		275					280					285			
Gln	Phe	Asp	Leu	Met	Ala	Arg	Thr	Pro	Tyr	Ile	Ala	Arg	His	Asn	Gly
	290					295					300				
Thr	Pro	Leu	Leu	Gln	Ala	Ile	Ser	Asn	Ala	Leu	Asn	Pro	Asn	Ala	Thr
305				310						315					320
Glu	Ser	Lys	Leu	Pro	Asp	Ile	Ser	Pro	Asp	Asn	Lys	Ile	Leu	Phe	Ile
				325					330					335	
Ala	Gly	His	Asp	Thr	Asn	Ile	Ala	Asn	Ile	Ala	Gly	Met	Leu	Asn	Met
			340					345					350		
Arg	Trp	Thr	Leu	Pro	Gly	Gln	Pro	Asp	Asn	Thr	Pro	Pro	Gly	Gly	Ala
		355					360					365			
Leu	Val	Phe	Glu	Arg	Leu	Ala	Asp	Lys	Ser	Gly	Lys	Gln	Tyr	Val	Ser
	370					375					380				
Val	Ser	Met	Val	Tyr	Gln	Thr	Leu	Glu	Gln	Leu	Arg	Ser	Gln	Thr	Pro
385					390					395					400
Leu	Ser	Leu	Asn	Gln	Pro	Ala	Gly	Ser	Val	Gln	Leu	Lys	Ile	Pro	Gly
				405					410					415	
Cys	Asn	Asp	Gln	Thr	Ala	Glu	Gly	Tyr	Cys	Pro	Leu	Ser	Thr	Phe	Thr
			420					425					430		
Arg	Val	Val	Ser	Gln	Ser	Val	Glu	Pro	Gly	Cys	Gln	Leu	Gln		
	435						440					445			

<210> 4

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador de oligonucleótido

<400> 4

cagcmgcccgc ggtaatwc

18

<210> 5

<211> 15

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador de oligonucleótido

<400> 5

acgggcggtg tgtrc

15

<210> 6

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Iniciador de oligonucleótido

<400> 6

ggaattcata tgacgatctc tgcgtttaac

30

<210> 7

<211> 33

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> iniciador de oligonucleótido

<400> 7

ggaattcgga tccttactgt agctggcagc ctg

33

Lisboa, 4 de Dezembro de 2012

REIVINDICAÇÕES

1. Molécula de ácido nucleico isolada selecionada de:

i) uma molécula de ácido nucleico isolada que codifica para um polipéptido seleccionado do grupo consistindo de:

- um polipéptido compreendendo a sequência de aminoácidos como apresentada em SEQ ID N°: 3 ou uma sequência de aminoácidos possuindo, pelo menos, 80% de identidade a esta;
- um polipéptido obtido da estirpe *Buttiauxella sp.* P1-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248;
- um polipéptido obtido pela expressão de SEQ ID N°: 2 ou uma sequência nucleotídica obtida da estirpe *Buttiauxella sp.* P1-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248 ou uma sequência nucleotídica possuindo, pelo menos, 80% de identidade a esta sequência; e
- um polipéptido obtido da estirpe *Buttiauxella sp.* P1-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248 e em que o péptido é obtido pela expressão de SEQ ID N°: 2 ou uma sequência nucleotídica obtida da estirpe *Buttiauxella sp.* P1-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248 ou uma sequência nucleotídica, possuindo, pelo menos, 80% de identidade a esta sequência,

em que o referido polipéptido possui actividade de

fitase, em que o referido polipéptido possui uma actividade específica de, pelo menos, 300 U/mg, em que a referida actividade específica é determinada por incubação do referido polipéptido numa solução contendo fitato 2 mM, CaCl_2 0,8 mM em 200 mM de tampão de acetato de sódio a pH 3,5, a uma temperatura de 37 °C.

- ii) uma molécula de ácido nucleico isolada compreendendo a sequência como apresentada em SEQ ID N°: 2;
- iii) um ácido nucleico que hibrida a SEQ ID N°: 2 sob condições restritivas a 50 °C e 0,2 X SSC.

2. Molécula de ácido nucleico isolada de acordo com a reivindicação 1 que codifica um polipéptido seleccionado do grupo consistindo de:

- um polipéptido compreendendo a sequência de aminoácidos como apresentada em SEQ ID N°: 3 ou uma sequência de aminoácidos possuindo, pelo menos, 80% de identidade a esta;
- um polipéptido obtido da estirpe *Buttiauxella sp.* P1-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248;
- um polipéptido obtido pela expressão de SEQ ID N°: 2 ou uma sequência nucleotídica obtida da estirpe *Buttiauxella sp.* P1-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248 ou uma sequência nucleotídica possuindo, pelo menos, 80% de identidade a esta sequência; e
- um polipéptido obtido da estirpe *Buttiauxella sp.* P1-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248 e em que o péptido é obtido pela expressão de

SEQ ID N°: 2 ou uma sequência nucleotídica obtida da estirpe *Buttiauxella* sp. Pl-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248 ou uma sequência nucleotídica, possuindo, pelo menos, 80% de identidade a esta sequência,

em que o referido polipéptido possui actividade de fitase, em que o referido polipéptido possui uma actividade específica de, pelo menos, 300 U/mg, em que a referida actividade específica é determinada por incubação do referido polipéptido numa solução contendo fitato 2 mM, CaCl_2 0,8 mM em 200 mM de tampão de acetato de sódio a pH 3,5, a uma temperatura de 37 °C.

3. Molécula de ácido nucleico isolada de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, compreendendo uma sequência nucleotídica que é a mesma, que ou complementar a, SEQ ID N°: 2, ou compreende uma sequência que possui, pelo menos, 80% de identidade de sequência com SEQ ID N°: 2.
4. Molécula de ácido nucleico isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que a referida molécula de ácido nucleico codifica um polipéptido possuindo um máximo de actividade a, aproximadamente, pH 3 a 6, em que a referida actividade é determinada por incubação do referido polipéptido numa solução contendo fitato 2 mM, CaCl_2 0,8 mM em tampão de acetato de sódio 200 mM a uma temperatura de 37 °C.
5. Molécula de ácido nucleico isolada de acordo com qualquer

uma das reivindicações 1 a 3, em que a referida molécula de ácido nucleico codifica um polipéptido possuindo um máximo de actividade a, aproximadamente, pH 4 a 5, em que a referida actividade é determinada por incubação do referido polipéptido numa solução contendo fitato 2 mM, CaCl_2 0,8 mM em tampão de acetato de sódio 200 mM a uma temperatura de 37 °C.

6. Molécula de ácido nucleico isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que a referida molécula de ácido nucleico codifica um polipéptido possuindo um máximo de actividade a, aproximadamente, pH 4,5, em que a referida actividade é determinada por incubação do referido polipéptido numa solução contendo fitato 2 mM, CaCl_2 0,8 mM em tampão de acetato de sódio 200 mM a uma temperatura de 37 °C.
7. Molécula de ácido nucleico isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que a referida molécula de ácido nucleico codifica um polipéptido compreendendo mutações em, pelo menos, uma das seguintes posições, numeradas de acordo com a numeração em SEQ ID N°: 3: K 59, T 70, A 122, D 125, T 167, H 193, F 197, T 204, T 209, A 211, S 221, I 223, S 225, K 240, A 242, D 244, A 268, S 281, Q 289, A 294, N 303, I 336 ou N 351.
8. Molécula de ácido nucleico isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, em que a referida molécula de ácido nucleico codifica um polipéptido compreendendo uma ou mais das seguintes mutações:

K 59 A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W
ou Y;

ou

T 70 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W
ou Y;

ou

A 122 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W
ou Y;

ou

D 125 A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W
ou Y;

ou

T 167 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W
ou Y;

ou

H 193 A, C, D, E, F, G, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W
ou Y;

ou

F 197 A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W
ou Y;

ou

T 204 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W
ou Y;

ou

T 209 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, V, W
ou Y;

ou

A 211 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W
ou Y;

ou

S 221 A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W

ou Y;

ou

D 223 A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W

ou Y;

ou

G 225 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W

ou Y;

ou

K 240 A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W

ou Y;

ou

A 242 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W

ou Y;

ou

D 244 A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W

ou Y;

ou

A 268 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W

ou Y;

ou

S 281 A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W

ou Y;

ou

Q 289 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W

ou Y;

ou

A 294 C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W

ou Y;

ou

N 303 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W

ou Y;

ou

I 336 A, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W
ou Y;

ou

N 351 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W
ou Y.

9. Molécula de ácido nucleico isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, em que a referida molécula de ácido nucleico codifica um polipéptido compreendendo, pelo menos, uma mutação seleccionada do grupo consistindo de: K59E; T167V; K240T; T167I; K240E; D244C; Q289Y; T209K ou F197S.

10. Molécula de ácido nucleico isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, em que a referida molécula de ácido nucleico codifica um polipéptido compreendendo uma combinação de mutações seleccionadas do grupo consistindo de:

D125E/H193R; ou

A294E/N303K; ou

T167I/K240T; ou

D223E/K240E/N351D; ou

T167I/K240T/A294E/N303K; ou

T167I/K240E/A242S/A294E/N303K; ou

A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A294E/N303K; ou

A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A242S/S281L/Q289Y/
A294E/N303K; ou

A122T/D125E/H193R/F197S/T209K/A211P/S221N/G225A/K240E/
A294E/N303K; ou

D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/
Q289H/A294E/N303K; ou
A122T/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/A268V/
Q289H/A294E/N303K/I336F; ou
N70Y/D125E/T167I/H193R/F197S/T204I/T209K/A211P/K240E/
A268V/Q289H/A294E/N303K.

11. Molécula de ácido nucleico isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, em que a referida molécula de ácido nucleico codifica um polipéptido compreendendo a combinação de mutações:

A122T/T167I/F197S/T209K/A211P/K240E/A242S/S281L/Q289Y/A294E/
N303K.

12. Molécula de ácido nucleico isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 10, em que a referida molécula de ácido nucleico codifica um polipéptido que é uma variante de enzima fitase que possui maior estabilidade térmica e/ou maior actividade específica e/ou maior estabilidade proteolítica comparada à enzima fitase codificada por SEQ ID N°: 2.

13. Plasmídeo ou sistema de vectores compreendendo uma molécula de ácido nucleico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12.

14. Plasmídeo ou sistema de vectores de acordo com a reivindicação 13, em que o referido plasmídeo ou sistema de vectores é um vector de expressão para a expressão de qualquer dos polipéptidos como definido em qualquer uma das

reivindicações 1 a 12 e/ou compreende polinucleótidos de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12 num microrganismo.

15. Célula hospedeira transformada ou transfectada com um plasmídeo ou sistema de vectores como reivindicado em qualquer das reivindicações 13 ou 14.
16. Célula hospedeira como reivindicada na reivindicação 15 que expressa um polipéptido como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 12.
17. Célula hospedeira como reivindicada na reivindicação 15 ou 16, em que a referida célula hospedeira é derivada de um microrganismo.
18. Célula hospedeira como reivindicada em qualquer uma das reivindicações 15 a 17, em que a referida célula hospedeira é seleccionada de bactérias e fungos.
19. Célula hospedeira como reivindicada em qualquer uma das reivindicações 15 a 18, em que a referida célula hospedeira é seleccionada de bactérias, leveduras e fungos filamentosos.
20. Célula hospedeira como reivindicada em qualquer uma das reivindicações 15 a 19, em que a referida célula hospedeira é seleccionada de *B. subtilis*, *E. coli*, *H. polymorpha*, *S. pombe*, *S. cerevisiae*, *Trichoderma spp.* e *Aspergillus spp.*
21. Célula hospedeira como reivindicada na reivindicação 20, em

que a referida *Aspergillus spp.* é *A. oryzae*.

22. Célula hospedeira como reivindicada em qualquer uma das reivindicações 15 a 20, em que a referida célula hospedeira é uma célula bacteriana procariótica, de um modo preferido, *E. coli*.
23. Célula hospedeira como reivindicada na reivindicação 22, em que a referida célula hospedeira é *E. coli*.
24. Célula bacteriana de estirpe *Buttiauxella sp.* P1-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248.
25. Método de produção de um polipéptido compreendendo transformar uma célula hospedeira com um polinucleótido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, em que o referido polipéptido é seleccionado do grupo consistindo de:
 - um polipéptido compreendendo a sequência de aminoácidos como apresentada em SEQ ID N°: 3 ou uma sequência de aminoácidos possuindo, pelo menos, 80% de identidade a esta;
 - um polipéptido obtido da estirpe *Buttiauxella sp.* P1-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248;
 - um polipéptido obtido pela expressão de SEQ ID N°: 2 ou uma sequência nucleotídica obtida da estirpe *Buttiauxella sp.* P1-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248 ou uma sequência nucleotídica possuindo, pelo menos, 80% de identidade a esta sequência; e
 - um polipéptido obtido da estirpe *Buttiauxella sp.*

P1-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248 e em que o péptido é obtido pela expressão de SEQ ID N°: 2 ou uma sequência nucleotídica obtida da estirpe *Buttiauxella* sp. P1-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248 ou uma sequência nucleotídica, possuindo, pelo menos, 80% de identidade a esta sequência,

em que o referido polipéptido possui actividade de fitase, em que o referido polipéptido possui uma actividade específica de, pelo menos, 300 U/mg, em que a referida actividade específica é determinada por incubação do referido polipéptido numa solução contendo fitato 2 mM, CaCl_2 0,8 mM em 200 mM de tampão de acetato de sódio a pH 3,5, a uma temperatura de 37 °C.

26. Método de produção de um polipéptido de acordo com a reivindicação 25, compreendendo transformar uma célula hospedeira com um polinucleótido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12 com um plasmídeo ou vector de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 ou 14.
27. Método de produção de um polipéptido de acordo com a reivindicação 25 ou reivindicação 26, em que a referida célula hospedeira é uma célula hospedeira como definida em qualquer uma das reivindicações 15 a 24.
28. Método de produção de um polipéptido compreendendo expressar um polinucleótido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, em que o referido polipéptido é seleccionado do grupo consistindo de:

- um polipéptido compreendendo a sequência de aminoácidos como apresentada em SEQ ID N°: 3 ou uma sequência de aminoácidos possuindo, pelo menos, 80% de identidade a esta;
- um polipéptido obtido da estirpe *Buttiauxella sp.* P1-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248;
- um polipéptido obtido pela expressão de SEQ ID N°: 2 ou uma sequência nucleotídica obtida da estirpe *Buttiauxella sp.* P1-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248 ou uma sequência nucleotídica possuindo, pelo menos, 80% de identidade a esta sequência; e
- um polipéptido obtido da estirpe *Buttiauxella sp.* P1-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248 e em que o péptido é obtido pela expressão de SEQ ID N°: 2 ou uma sequência nucleotídica obtida da estirpe *Buttiauxella sp.* P1-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248 ou uma sequência nucleotídica, possuindo, pelo menos, 80% de identidade a esta sequência,

em que o referido polipéptido possui actividade de fitase, em que o referido polipéptido possui uma actividade específica de, pelo menos, 300 U/mg, em que a referida actividade específica é determinada por incubação do referido polipéptido numa solução contendo fitato 2 mM, CaCl_2 0,8 mM em 200 mM de tampão de acetato de sódio a pH 3,5, a uma temperatura de 37 °C.

29. Método de produção de um polipéptido de acordo com a reivindicação 28, compreendendo expressar um polinucleótido, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, num plasmídeo ou vector de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 ou 14.

30. Método de produção de um polipéptido compreendendo expressar um polinucleótido de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12 numa célula hospedeira num meio de cultura e separar o referido polipéptido do meio de cultura da célula hospedeira, em que o referido polipéptido é seleccionado do grupo consistindo de:

- um polipéptido compreendendo a sequência de aminoácidos como apresentada em SEQ ID N°: 3 ou uma sequência de aminoácidos possuindo, pelo menos, 80% de identidade a esta;
- um polipéptido obtido da estirpe *Buttiauxella* sp. P1-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248;
- um polipéptido obtido pela expressão de SEQ ID N°: 2 ou uma sequência nucleotídica obtida da estirpe *Buttiauxella* sp. P1-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248 ou uma sequência nucleotídica possuindo, pelo menos, 80% de identidade a esta sequência; e
- um polipéptido obtido da estirpe *Buttiauxella* sp. P1-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248 e em que o péptido é obtido pela expressão de SEQ ID N°: 2 ou uma sequência nucleotídica obtida da estirpe *Buttiauxella* sp. P1-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248 ou uma sequência

nucleotídica, possuindo, pelo menos, 80% de identidade a esta sequência,

em que o referido polipéptido possui actividade de fitase, em que o referido polipéptido possui uma actividade específica de, pelo menos, 300 U/mg, em que a referida actividade específica é determinada por incubação do referido polipéptido numa solução contendo fitato 2 mM, CaCl_2 0,8 mM em 200 mM de tampão de acetato de sódio a pH 3,5, a uma temperatura de 37 °C.

31. Método de produção de um polipéptido de acordo com a reivindicação 30, compreendendo expressar um polinucleótido, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, num plasmídeo ou vector de acordo com qualquer uma das reivindicações 13 ou 14 numa célula hospedeira.
32. Molécula de ácido nucleico isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12, em que a referida molécula de ácido nucleico codifica um polipéptido compreendendo a sequência de aminoácidos como apresentada em SEQ ID N°: 3 ou numa sequência de aminoácidos possuindo, pelo menos, 85% de identidade a esta.
33. Molécula de ácido nucleico isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12, em que a referida molécula de ácido nucleico codifica um polipéptido obtido da estirpe *Buttiauxella* sp. P1-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248.

34. Molécula de ácido nucleico isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12, em que a referida molécula de ácido nucleico codifica um polipéptido obtido pela expressão de SEQ ID N°: 2 ou de uma sequência nucleotídica obtida da estirpe *Buttiauxella* sp. P1-29, depositada sob o número de acesso NCIMB 41248 ou uma sequência nucleotídica possuindo, pelo menos, 85% de identidade com esta sequência.
35. Molécula de ácido nucleico isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12, em que a referida molécula de ácido nucleico codifica um polipéptido obtido pela expressão de SEQ ID N°: 2.
36. Molécula de ácido nucleico isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12, que hibrida a SEQ ID N°: 2 sob condições restritivas a 50 °C e 0,2x SSC.
37. Molécula de ácido nucleico isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12, em que a referida molécula de ácido nucleico codifica um polipéptido compreendendo a sequência de aminoácidos como apresentada em SEQ ID N°: 3.
38. Molécula de ácido nucleico isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12, em que a referida molécula de ácido nucleico codifica um polipéptido compreendendo uma sequência de aminoácidos possuindo, pelo menos, 90% de identidade a SEQ ID N°: 3.
39. Molécula de ácido nucleico isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12, em que a referida molécula de ácido nucleico codifica um polipéptido compreendendo uma sequência de aminoácidos possuindo, pelo menos, 95% de

identidade a SEQ ID N°: 3.

40. Molécula de ácido nucleico isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12, em que a referida molécula de ácido nucleico codifica um polipéptido compreendendo uma sequência de aminoácidos possuindo, pelo menos, 96% de identidade a SEQ ID N°: 3.
41. Molécula de ácido nucleico isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12, em que a referida molécula de ácido nucleico codifica um polipéptido compreendendo uma sequência de aminoácidos possuindo, pelo menos, 97% de identidade a SEQ ID N°: 3.
42. Molécula de ácido nucleico isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12, em que a referida molécula de ácido nucleico codifica um polipéptido compreendendo uma sequência de aminoácidos possuindo, pelo menos, 98% de identidade a SEQ ID N°: 3.
43. Molécula de ácido nucleico isolada de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-12, em que a referida molécula de ácido nucleico codifica um polipéptido compreendendo uma sequência de aminoácidos possuindo, pelo menos, 99% de identidade a SEQ ID N°: 3.

Lisboa, 4 de Dezembro de 2012

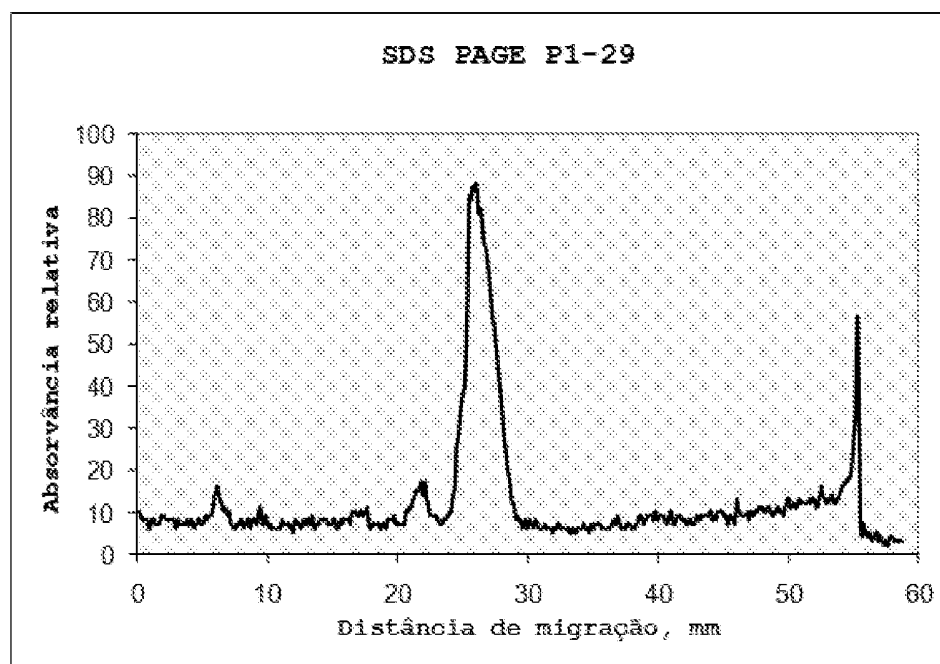


Figura 1

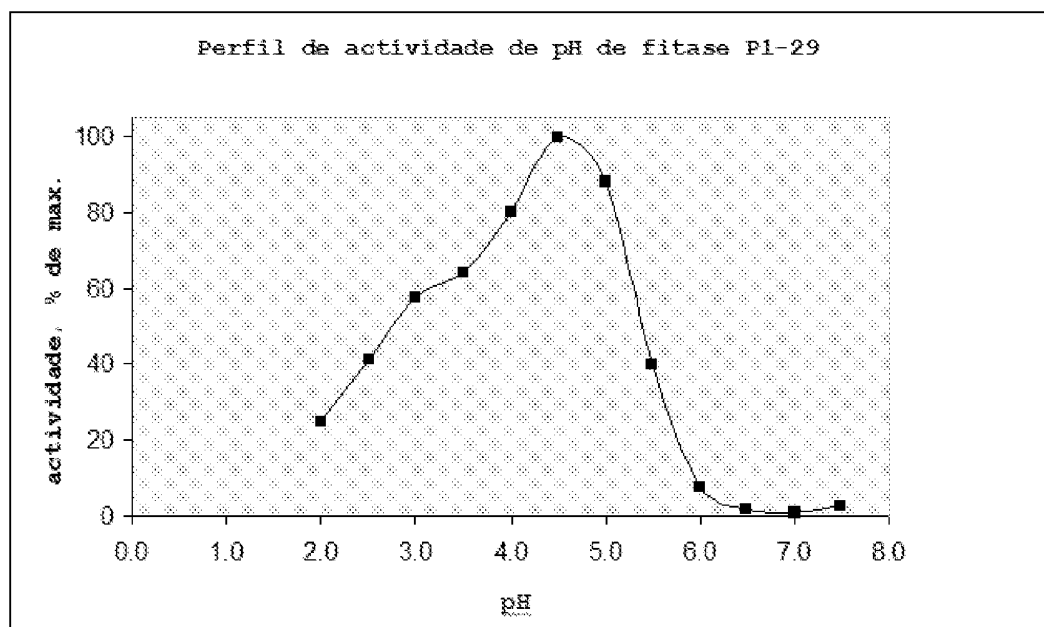


Figura 2.

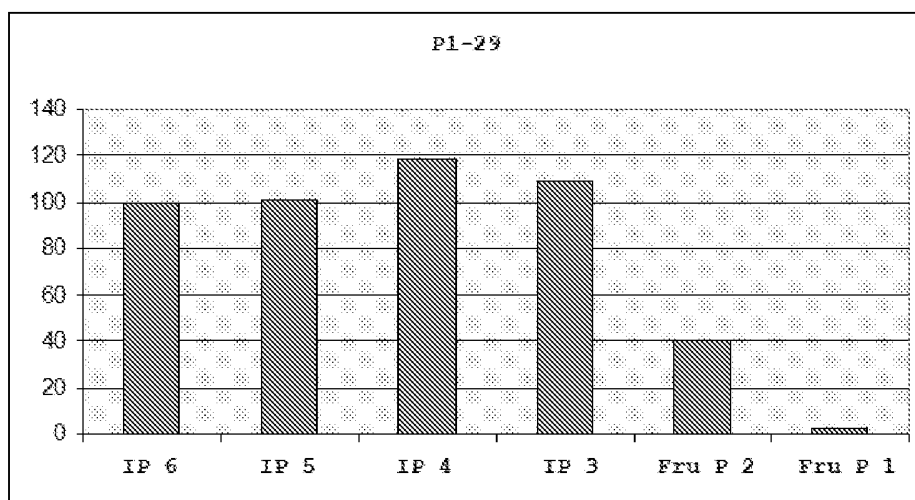


Figura 3