



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0717181-1 B1



(22) Data do Depósito: 21/09/2007

(45) Data de Concessão: 05/04/2022

(54) Título: ÁCIDO NUCLEICO, CASSETE DE EXPRESSÃO, VETOR, VEÍCULO DE CLONAGEM, MICRORGANISMO TRANSGÊNICO, POLIPEPTÍDEO DE FITASE, POLIPEPTÍDEO IMOBILIZADO OU ÁCIDO NUCLEICO IMOBILIZADO, PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE UM POLIPEPTÍDEO RECOMBINANTE, PARA HIDROLISAR UM INOSITOL-HEXAFOSFATO EM INOSITOL E FOSFATO INORGÂNICO, PARA DEGOMAGEM DE ÓLEO, PARA PRODUÇÃO DE UM ALIMENTO, PRODUTO ALIMENTÍCIO OU SUPLEMENTO ALIMENTAR, PARA PROCESSAMENTO DE GRÃOS DE MILHO E DE SORGO, ALIMENTO, PRODUTO ALIMENTÍCIO OU SUPLEMENTO ALIMENTAR, COMPOSIÇÃO, E, USO DE UM POLIPEPTÍDEO

(51) Int.Cl.: C12N 15/55; C07H 21/04; A01N 63/00; A61K 48/00; C12N 5/00; (...).

(30) Prioridade Unionista: 21/09/2006 US 60/846,831.

(73) Titular(es): BASF ENZYMES LLC.

(72) Inventor(es): BRIAN STEER; MARK DYCAICO; KATIE KLINE; AXEL TREFZER; TOM TODARO; ARNE I. SOLBAK, JR.; FATIMA EL-FARRAH; ALBERTO ALVARADO; GERHARD FREY.

(86) Pedido PCT: PCT US2007079187 de 21/09/2007

(87) Publicação PCT: WO 2008/036916 de 27/03/2008

(85) Data do Início da Fase Nacional: 20/03/2009

(57) Resumo: FITASES, ÁCIDOS NUCLEICOS QUE CODIFICAM AS MESMAS E PROCESSO PARA A PRODUÇÃO E PARA A UTILIZAÇÃO DAS MESMAS. A presente invenção refere-se às fitases, aos polinucleotídeos que codificam as mesmas, aos usos dos polinucleotídeos e dos polipeptídeos da invenção, assim como à produção e ao isolamento de tais polinucleotídeos e polipeptídeos. Em particular, a invenção fornece polipeptídeos que possuem atividade de fitases sob condições de alta temperatura e fitases que mantêm a atividade após a exposição a altas temperaturas. As fitases da invenção podem ser termotolerantes e/ou termoestáveis a baixas temperaturas, em adição a temperaturas mais altas. As fitases da invenção podem ser utilizadas em matérias alimentícias para aumentar o valor alimentício de ingredientes ricos em fitato. As fitases da invenção podem ser formulados na forma de alimentos ou de produtos alimentícios ou de suplementos para qualquer um destes, por exemplo, para auxiliar na digestão do fitato. Os alimentos ou os produtos alimentícios da invenção podem estar na forma de póletes, de líquidos, de pós e similares. Em um aspecto, as fitases da invenção são estáveis contra a desnaturação térmica durante a peletização; e isto diminui o custo do produto de fitase enquanto são mantidas a eficiência in (...).

ÁCIDO NUCLEICO, CASSETTE DE EXPRESSÃO, VETOR, VEÍCULO DE CLONAGEM, MICRORGANISMO TRANSGÊNICO, POLIPEPTÍDEO DE FITASE, POLIPEPTÍDEO IMOBILIZADO OU ÁCIDO NUCLEICO IMOBILIZADO, PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE UM POLIPEPTÍDEO RECOMBINANTE, PARA HIDROLISAR UM INOSITOL-HEXAFOSFATO EM INOSITOL E FOSFATO INORGÂNICO, PARA DEGOMAGEM DE ÓLEO, PARA PRODUÇÃO DE UM ALIMENTO, PRODUTO ALIMENTÍCIO OU SUPLEMENTO ALIMENTAR, PARA PROCESSAMENTO DE GRÃOS DE MILHO E DE SORGO, ALIMENTO, PRODUTO ALIMENTÍCIO OU SUPLEMENTO ALIMENTAR, COMPOSIÇÃO, E, USO DE UM POLIPEPTÍDEO

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção refere-se às fitases, aos polinucleotídeos que codificam as mesmas, aos usos dos polinucleotídeos e aos polipeptídeos da invenção, assim como à produção e ao isolamento de tais polinucleotídeos e polipeptídeos. Em particular, a invenção fornece polipeptídeos que possuem atividade de fitase sob condições de alta temperatura e fitases que mantêm a atividade após a exposição a altas temperaturas. As fitases da invenção podem ser termotolerantes e/ou termoestáveis a baixas temperaturas, em adição a temperaturas mais altas. As fitases da invenção podem ser utilizadas em matérias alimentícias para aumentar o valor alimentício de ingredientes ricos em fitato. As fitases da invenção podem ser formuladas na forma de alimentos ou rações ou suplementos para qualquer um destes para, por exemplo, ajudar na digestão do fitato. Os alimentos ou os rações da invenção podem estar na forma de péletes, líquidos, pós e similares. Em um aspecto, as fitases da invenção são estáveis contra a desnaturação térmica durante a peletização; e isto diminui o

custo da produção de fitase enquanto a eficiência e a detecção da atividade in vivo são mantidas no produto alimentício.

ANTECEDENTES

[002] Os minerais são elementos essenciais para o crescimento de todos os organismos. Os minerais dietéticos podem ser derivados de muitas fontes de materiais, incluindo plantas. Por exemplo, as sementes de plantas são uma fonte rica de minerais uma vez que contêm íons que são complexados com os grupos fosfato de moléculas de ácido fítico. Estes minerais associados ao fitato podem, em alguns casos, satisfazer as necessidades dietéticas de algumas espécies de organismos de fazenda, tais como ruminantes com vários estômagos. Consequentemente, em alguns casos, os ruminantes requerem menor suplementação dietética com fosfato inorgânico e minerais porque os micro-organismos no rúmen produzem enzimas que catalisam a conversão de fitato (mio-inositol-hexafosfato) em inositol e fosfato inorgânico. No processo, os minerais que foram complexados com o fitato são liberados. A maior parte das espécies de organismos de fazenda, entretanto, é incapaz de utilizar eficientemente minerais associados ao fitato. Assim, por exemplo, na produção para gado de animais monogástricos (por exemplo, porcos, aves e peixes), o produto alimentício é comumente suplementado com minerais e/ou com substâncias antibióticas que alteram o ambiente da flora digestiva do organismo consumidor para aumentar as taxas de crescimento.

[003] Como tal, há muitas dificuldades problemáticas – relacionadas à nutrição, às etapas de processamento ex vivo, à saúde e à medicina, à conservação do ambiente e ao controle de recursos – que estão associadas com uma hidrólise insuficiente do fitato em muitas aplicações. A seguir estão exemplos não-limitantes destes problemas:

1) A suplementação de dietas com minerais inorgânicos tem um custo caro.

[004] 2) A presença de fitato não-hidrolisado é indesejável e problemática em muitas aplicações ex vivo (por exemplo, por causar a presença de sedimentos indesejáveis).

[005] 3) A suplementação de dietas com antibióticos apresenta um perigo medicinal a seres humanos e animais similares através do aumento da abundância de agentes patogênicos tolerantes a antibióticos.

[006] 4) A descarga de minerais fecais não-absorvidos no ambiente atrapalha e danifica os ecossistemas dos solos circundantes, das águas de criação de peixes e das águas de superfície de forma geral.

[007] 5) As ofertas nutricionais valiosas de muitas matérias alimentícias potenciais permanecem significativamente não-aproveitadas e dispersas.

[008] Consequentemente, as matérias alimentícias que contêm fitato requerem suplementação com nutrientes exógenos e/ou com uma fonte de atividade de fitase para corrigir suas ofertas nutricionais deficientes após o consumo por um número muito grande de espécies de organismos.

[009] Consequentemente, há uma necessidade de meios para conseguir a hidrólise eficiente e barata do fitato em várias aplicações. Particularmente, há uma necessidade de meios para otimizar a hidrólise do fitato em aplicações comerciais. Em um aspecto particular, há uma necessidade de otimizar métodos de tratamentos comerciais que aumentam as ofertas nutricionais de matérias alimentícias que contêm fitato para o consumo por seres humanos e animais de fazenda.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0010] Esta invenção fornece polipeptídeos que possuem atividade

de fitase, polinucleotídeos que codificam os mesmos, usos dos polinucleotídeos e dos polipeptídeos da invenção e métodos para a produção e para o isolamento de tais polinucleotídeos e polipeptídeos. Em um aspecto, a invenção fornece polipeptídeos que possuem atividade de fitase sob condições de alta temperatura e fitases que mantêm atividade após a exposição a altas temperaturas. As fitases da invenção podem ser utilizadas em matérias alimentícias para aumentar o valor alimentício de ingredientes ricos em fitato. As fitases da invenção podem ser formuladas na forma de alimentos ou de rações ou de suplementos para qualquer um destes para, por exemplo, auxiliar na digestão do fitato. Os alimentos ou os rações da invenção podem estar na forma de péletes, comprimidos, pílulas, líquidos, pós, sprays e similares. Em um aspecto, as fitases da invenção são estáveis contra a desnaturação térmica durante a peletização; e isto diminui o custo do produto de fitase enquanto que a eficiência e a detecção da atividade in vivo são mantidas no produto alimentício.

SUMÁRIO:

[0011] A invenção fornece ácidos nucleicos isolados, sintéticos ou recombinantes que compreendem

(a) (i) uma sequência de ácido nucleico que possui pelo menos 95%, 96% 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 1 e que compreende pelo menos uma, duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze, treze ou todas as quatorze modificações de sequências de pares de bases de nucleotídeos na SEQ ID NO: 1, selecionadas do grupo que consiste em: os nucleotídeos nas posições 139 até 141 são TTT ou TTC; os nucleotídeos nas posições 289 até 291 são GTT, GTC, GTA ou GTG; os nucleotídeos nas posições 289 até 291 são GAA ou GAG; os nucleotídeos nas posições 406 até 408 são CAT ou CAC; os

nucleotídeos nas posições 475 até 477 são GTT, GTC, GTA ou GTG; os nucleotídeos nas posições 475 até 477 são GAA ou GAG; os nucleotídeos nas posições 487 até 489 são CGT, CGC, CGA, CGG, AGA ou AGG; os nucleotídeos nas posições 490 até 492 são CGT, CGC, CGA, CGG, AGA ou AGG; os nucleotídeos nas posições 502 até 504 são CGT, CGC, CGA, CGG, AGA ou AGG; os nucleotídeos nas posições 535 até 537 são CGT, CGC, CGA, CGG, AGA ou AGG; os nucleotídeos nas posições 676 até 678 são GAT ou GAC; os nucleotídeos nas posições 697 até 699 são TGG; os nucleotídeos nas posições 823 até 825 são GTT, GTC, GTA ou GTG; os nucleotídeos nas posições 865 até 867 são GCT, GCC, GCA ou GCG; os nucleotídeos nas posições 1045 até 1047 são TAT ou TAC; e os nucleotídeos nas posições 1087 até 1089 são CCA, CCC, CCG ou CCT; ou,

(ii) uma sequência de ácido nucleico que possui pelo menos 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 1 e que compreende pelo menos uma, duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze, treze ou todas as quatorze modificações de sequências de pares de bases de nucleotídeos na SEQ ID NO: 1, selecionadas do grupo que consiste em: os nucleotídeos no equivalente das posições 139 até 141 são TTT ou TTC; os nucleotídeos no equivalente das posições 289 até 291 são GTT, GTC, GTA ou GTG; os nucleotídeos no equivalente das posições 289 até 291 são GAA ou GAG; os nucleotídeos no equivalente das posições 406 até 408 são CAT ou CAC; os nucleotídeos no equivalente das posições 475 até 477 são GTT, GTC, GTA ou GTG; os nucleotídeos no equivalente das posições 475 até 477 são GAA ou GAG; os nucleotídeos no equivalente das posições 487 até 489 são CGT, CGC, CGA, CGG, AGA ou AGG; os nucleotídeos no equivalente das posições 490 até 492 são CGT, CGC, CGA, CGG, AGA ou AGG; os nucleotídeos no

equivalente das posições 502 até 504 são CGT, CGC, CGA, CGG, AGA ou AGG; os nucleotídeos no equivalente das posições 535 até 537 são CGT, CGC, CGA, CGG, AGA ou AGG; os nucleotídeos no equivalente das posições 676 até 678 são GAT ou GAC; os nucleotídeos no equivalente das posições 697 até 699 são TGG; os nucleotídeos no equivalente das posições 823 até 825 são GTT, GTC, GTA ou GTG; os nucleotídeos no equivalente das posições 865 até 867 são GCT, GCC, GCA ou GCG; os nucleotídeos no equivalente das posições 1045 até 1047 são TAT ou TAC; e os nucleotídeos no equivalente das posições 1087 até 1089 são CCA, CCC, CCG ou CCT; ou

(iii) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que possui uma sequência que compreende pelo menos uma, duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze, treze ou todas as quatorze das modificações de resíduos de aminoácidos na SEQ ID NO: 2, selecionadas do grupo que consiste em: o aminoácido alanina na posição de aminoácido 47 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma fenilalanina; o aminoácido cisteína na posição de aminoácido 97 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma valina; o aminoácido cisteína na posição de aminoácido 97 da SEQ ID NO: 2 é alterado para um ácido glutâmico; o aminoácido no equivalente da treonina na posição de aminoácido 136 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma histidina; o aminoácido asparagina na posição de aminoácido 159 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma valina; o aminoácido asparagina na posição de aminoácido 159 da SEQ ID NO: 2 é alterado para um ácido glutâmico; o aminoácido no equivalente da treonina na posição de aminoácido 163 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma arginina; o aminoácido ácido aspártico na posição de aminoácido 164 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma arginina; o aminoácido ácido glutâmico na posição de aminoácido 168 da

SEQ ID NO: 2 é alterado para uma arginina; o aminoácido glicina na posição de aminoácido 179 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma arginina; o aminoácido cisteína na posição de aminoácido 226 da SEQ ID NO: 2 é alterado para um ácido aspártico; o aminoácido valina na posição de aminoácido 233 da SEQ ID NO: 2 é alterado para um triptofano; o aminoácido glutamina na posição de aminoácido 275 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma valina; o aminoácido arginina na posição de aminoácido 289 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma alanina; o aminoácido treonina na posição de aminoácido 349 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma tirosina; e o aminoácido leucina na posição de aminoácido 363 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma prolina; ou,

(iv) um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo que possui uma sequência que compreende pelo menos uma, duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze, treze ou todas as quatorze das modificações de resíduos de aminoácidos na SEQ ID NO: 2, selecionadas do grupo que consiste em: o aminoácido no equivalente da alanina na posição de aminoácido 47 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma fenilalanina; o aminoácido no equivalente da cisteína na posição de aminoácido 97 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma valina; o aminoácido no equivalente da cisteína na posição de aminoácido 97 da SEQ ID NO: 2 é alterado para um ácido glutâmico; o aminoácido no equivalente da treonina na posição de aminoácido 136 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma histidina; o aminoácido no equivalente da asparagina na posição de aminoácido 159 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma valina; o aminoácido no equivalente da asparagina na posição de aminoácido 159 da SEQ ID NO: 2 é alterado para um ácido glutâmico; o aminoácido no equivalente da treonina na posição de aminoácido 163 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma arginina; o

aminoácido no equivalente do ácido aspártico na posição de aminoácido 164 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma arginina; o aminoácido no equivalente do ácido glutâmico na posição de aminoácido 168 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma arginina; o aminoácido no equivalente da glicina na posição de aminoácido 179 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma arginina; o aminoácido no equivalente da cisteína na posição de aminoácido 226 da SEQ ID NO: 2 é alterado para um ácido aspártico; o aminoácido no equivalente da valina na posição de aminoácido 233 da SEQ ID NO: 2 é alterado para um triptofano; o aminoácido no equivalente da glutamina na posição de aminoácido 275 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma valina; o aminoácido no equivalente da arginina na posição de aminoácido 289 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma alanina; o aminoácido no equivalente da treonina na posição de aminoácido 349 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma tirosina; e o aminoácido no equivalente da leucina na posição de aminoácido 363 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma prolina, em que os ácidos nucleicos codificam pelo menos um polipeptídeo que possui uma atividade de fitase e opcionalmente as identidades de sequência são determinadas através da análise com um algoritmo de comparação de sequências ou através de uma inspeção visual; ou, (b) sequências totalmente complementares da mesma. Todos estes ácidos nucleicos são "ácidos nucleicos da invenção", que codificam "polipeptídeos da invenção".

[0012] Em um aspecto, o algoritmo de comparação de sequências é um algoritmo BLAST versão 2.2.2 no qual o ajuste de filtro é feito em `blastall -p blastp -d "nr pataa" -F F` e outras opções são ajustadas como valores predefinidos.

[0013] Em um aspecto, a atividade de fitase compreende: a catálise de fitato (mio-inositol-hexafosfato) em inositol e fosfato inorgânico; ou, a

hidrólise de fitato (mio-inositol-hexafosfato). Em um aspecto, a atividade de fitase é termotolerante e opcionalmente o polipeptídeo mantém a atividade de fitase após a exposição a uma temperatura na faixa entre aproximadamente 40°C até aproximadamente 70°C ou entre aproximadamente 37°C até aproximadamente 100°C ou maior que 37°C até aproximadamente 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C, 85°C, 90°C, 95°C, 100°C ou superior. Em um aspecto, a atividade de fitase é termoestável e opcionalmente o polipeptídeo mantém a atividade de fitase a uma temperatura na faixa entre aproximadamente 40°C até aproximadamente 70°C ou entre aproximadamente 37°C até aproximadamente 100°C ou maior que 37°C até aproximadamente 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, 70°C, 75°C, 80°C, 85°C, 90°C, 95°C, 100°C ou superior.

[0014] A invenção fornece cassetes de expressão, vetores, veículos de clonagem, vetores de expressão, vetores de clonagem que compreendem um ácido nucleico da invenção ou que possuem contido nos mesmos um ácido nucleico da invenção (que inclui ácidos nucleicos que codificam os polipeptídeos da invenção), em que opcionalmente o veículo de clonagem compreende ou é um vetor viral, um plasmídeo, um fago, um fagemídeo, um cosmídeo, um fosmídeo, um bacteriófago ou um cromossomo artificial e, opcionalmente, o vetor viral compreende um vetor de adenovírus, vetores retrovirais ou um vetor viral associado a adeno e, opcionalmente, o cassete de expressão, o vetor, o veículo de clonagem, o vetor de expressão, o vetor de clonagem compreende ou está contido em um cromossomo artificial de bactéria (BAC), um plasmídeo, um vetor derivado do bacteriófago P1 (PAC), um cromossomo artificial de levedura (YAC), um cromossomo artificial de mamífero (MAC).

[0015] A invenção fornece células transformadas, células que

sofreram transdução, células hospedeiras e similares que compreendem um ácido nucleico da invenção ou que possuem contido nas mesmas um ácido nucleico da invenção (que inclui ácidos nucleicos que codificam os polipeptídeos da invenção) ou cassete de expressão, o vetor, o veículo de clonagem, o vetor de expressão, o vetor de clonagem da invenção, em que opcionalmente a célula é uma célula bacteriana, uma célula de mamífero, uma célula de fungo, uma célula de levedura, uma célula de inseto ou uma célula vegetal.

[0016] A invenção fornece animais não-humanos transgênicos que compreendem um ácido nucleico da invenção ou que possuem contido nos mesmos um ácido nucleico da invenção (que inclui ácidos nucleicos que codificam os polipeptídeos da invenção) ou o cassete de expressão, o vetor, o veículo de clonagem, o vetor de expressão, o vetor de clonagem da invenção, em que opcionalmente o animal é um camundongo, um rato, uma cabra, um coelho, uma ovelha, um porco ou uma vaca.

[0017] A invenção fornece plantas transgênicas (incluindo partes de plantas, por exemplo, processadas ou colhidas, por exemplo, folhas, caules, raízes ou frutos) ou sementes que compreendem um ácido nucleico da invenção ou que possuem contido nas mesmas um ácido nucleico da invenção (que inclui ácidos nucleicos que codificam os polipeptídeos da invenção) ou o cassete de expressão, o vetor, o veículo de clonagem, o vetor de expressão, o vetor de clonagem da invenção, em que opcionalmente a planta é uma planta de milho, uma planta de batata, uma planta de tomate, uma planta de trigo, uma planta de semente oleosa, uma planta de semente de colza, uma planta de soja ou uma planta de tabaco e opcionalmente a semente é uma semente de milho, um grão de trigo, uma semente oleosa, uma semente de colza, uma semente de soja, uma semente de palma, uma

semente de girassol, uma semente de gergelim, um amendoim ou uma semente de planta de tabaco. Em modalidades alternativas, a planta ou uma semente produzida partindo de uma semente ou de uma planta da invenção ou uma planta ou uma semente da invenção, pode incluir plantas de cultivo, por exemplo, milho, alfalfa, girassol, Brassica, soja, cana de açúcar, algodão, açafrão, amendoim, sorgo, trigo, aveia, centeio, painço, cevada, arroz, coníferas, plantas de cultivo leguminosas, por exemplo, ervilha, feijão e soja, tubérculo/raízes que contêm amido, por exemplo, batata, batata doce, mandioca, inhame branco, bananeirinha e beterraba e similares ou a planta pode ser uma planta de milho, uma planta de batata, uma planta de tomate, uma planta de trigo, uma planta de semente oleosa, uma planta de semente de colza, uma planta de soja ou uma planta de tabaco ou uma forragem e/ou uma planta de alimentação para um animal ou para um animal ruminante ou a planta pode ser ou compreende a forragem ou a planta de alimentação é feno, milho, painço, soja, trigo, trigo mourão, cevada, alfalfa, centeio, uma gramínea anual, sorgo, sorgo bicolor, grama da estepe ou capim búfalo; ou, a semente é uma semente de milho, um grão de trigo, uma semente oleosa, uma semente de colza, uma semente de soja, uma semente de palma, uma semente de girassol, uma semente de gergelim, um amendoim ou uma semente de amendoim, uma semente de alfalfa, uma semente de algodão, uma semente de açafrão, uma semente de sorgo, um grão de aveia, uma semente de centeio, uma semente de painço, uma semente de cevada, um grão de arroz, uma semente de ervilha ou uma semente de planta de tabaco ou a planta é milho, alfalfa, girassol, Brassica, soja, cana de açúcar, algodão, açafrão, amendoim, sorgo, trigo, aveia, centeio, painço, cevada, arroz, coníferas, ervilha, feijão, soja, batata, batata doce, mandioca, inhame branco, bananeirinha ou beterraba.

[0018] A invenção fornece oligonucleotídeos antissenso que compreendem um ácido nucleico da invenção e pelo menos uma, duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze, treze ou todas as quatorze modificações de sequências de pares de bases de nucleotídeos na SEQ ID NO: 1, em que opcionalmente o oligonucleotídeo antissenso tem entre aproximadamente 10 até 50, aproximadamente 20 até 60, aproximadamente 30 até 70, aproximadamente 40 até 80, aproximadamente 60 até 100 ou aproximadamente 50 até 150 bases de comprimento. A invenção fornece ainda ribozimas e/ou iRNA (por exemplo, siRNA ou miRNA) que compreende sequências antissenso da invenção.

[0019] A invenção fornece métodos de inibição da tradução de uma mensagem de fitase em uma célula que compreende a administração à célula ou a expressão na célula de um oligonucleotídeo antissenso da invenção.

[0020] A invenção fornece polipeptídeos isolados, sintéticos ou recombinantes que compreendem

(a) (i) uma sequência de aminoácidos que possui pelo menos 95%, 96% 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 2 e codificada por um polinucleotídeo que compreende pelo menos uma, duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze, treze ou todas as quatorze modificações de sequências de pares de bases de nucleotídeos na SEQ ID NO: 1, selecionadas do grupo que consiste em: os nucleotídeos nas posições 139 até 141 são TTT ou TTC; os nucleotídeos nas posições 289 até 291 são GTT, GTC, GTA ou GTG; os nucleotídeos nas posições 289 até 291 são GAA ou GAG; os nucleotídeos nas posições 406 até 408 são CAT ou CAC; os nucleotídeos nas posições 475 até 477 são GTT, GTC, GTA ou GTG; os nucleotídeos nas posições 475 até 477 são GAA ou GAG; os nucleotídeos nas posições 487 até 489 são CGT, CGC,

CGA, CGG, AGA ou AGG; os nucleotídeos nas posições 490 até 492 são CGT, CGC, CGA, CGG, AGA ou AGG; os nucleotídeos nas posições 502 até 504 são CGT, CGC, CGA, CGG, AGA ou AGG; os nucleotídeos nas posições 535 até 537 são CGT, CGC, CGA, CGG, AGA ou AGG; os nucleotídeos nas posições 676 até 678 são GAT ou GAC; os nucleotídeos nas posições 697 até 699 são TGG; os nucleotídeos nas posições 823 até 825 são GTT, GTC, GTA ou GTG; os nucleotídeos nas posições 865 até 867 são GCT, GCC, GCA ou GCG; os nucleotídeos nas posições 1045 até 1047 são TAT ou TAC; e os nucleotídeos nas posições 1087 até 1089 são CCA, CCC, CCG ou CCT; ou,

(ii) uma sequência de aminoácidos que possui pelo menos 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 2 e codificada por um polinucleotídeo que compreende pelo menos uma, duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze, treze ou todas as quatorze modificações de sequências de pares de bases de nucleotídeos na SEQ ID NO: 1, selecionadas do grupo que consiste em: os nucleotídeos no equivalente das posições 139 até 141 são TTT ou TTC; os nucleotídeos no equivalente das posições 289 até 291 são GTT, GTC, GTA ou GTG; os nucleotídeos no equivalente das posições 289 até 291 são GAA ou GAG; os nucleotídeos no equivalente das posições 406 até 408 são CAT ou CAC; os nucleotídeos no equivalente das posições 475 até 477 são GTT, GTC, GTA ou GTG; os nucleotídeos no equivalente das posições 475 até 477 são GAA ou GAG; os nucleotídeos no equivalente das posições 487 até 489 são CGT, CGC, CGA, CGG, AGA ou AGG; os nucleotídeos no equivalente das posições 490 até 492 são CGT, CGC, CGA, CGG, AGA ou AGG; os nucleotídeos no equivalente das posições 502 até 504 são CGT, CGC, CGA, CGG, AGA ou AGG; os nucleotídeos no equivalente das

posições 535 até 537 são CGT, CGC, CGA, CGG, AGA ou AGG; os nucleotídeos no equivalente das posições 676 até 678 são GAT ou GAC; os nucleotídeos no equivalente das posições 697 até 699 são TGG; os nucleotídeos no equivalente das posições 823 até 825 são GTT, GTC, GTA ou GTG; os nucleotídeos no equivalente das posições 865 até 867 são GCT, GCC, GCA ou GCG; os nucleotídeos no equivalente das posições 1045 até 1047 são TAT ou TAC; e os nucleotídeos no equivalente das posições 1087 até 1089 são CCA, CCC, CCG ou CCT; ou

(iii) uma sequência de aminoácidos que compreende pelo menos uma, duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze, treze ou todas as quatorze modificações de resíduos de aminoácidos na SEQ ID NO: 2, selecionadas do grupo que consiste em: o aminoácido alanina na posição de aminoácido 47 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma fenilalanina; o aminoácido cisteína na posição de aminoácido 97 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma valina; o aminoácido cisteína na posição de aminoácido 97 da SEQ ID NO: 2 é alterado para um ácido glutâmico; o aminoácido no equivalente da treonina na posição de aminoácido 136 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma histidina; o aminoácido asparagina na posição de aminoácido 159 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma valina; o aminoácido asparagina na posição de aminoácido 159 da SEQ ID NO: 2 é alterado para um ácido glutâmico; o aminoácido no equivalente da treonina na posição de aminoácido 163 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma arginina; o aminoácido ácido aspártico na posição de aminoácido 164 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma arginina; o aminoácido ácido glutâmico na posição de aminoácido 168 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma arginina; o aminoácido glicina na posição de aminoácido 179 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma arginina; o aminoácido cisteína na posição de

aminoácido 226 da SEQ ID NO: 2 é alterado para um ácido aspártico; o aminoácido valina na posição de aminoácido 233 da SEQ ID NO: 2 é alterado para um triptofano; o aminoácido glutamina na posição de aminoácido 275 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma valina; o aminoácido arginina na posição de aminoácido 289 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma alanina; o aminoácido treonina na posição de aminoácido 349 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma tirosina; e o aminoácido leucina na posição de aminoácido 363 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma prolina; ou

(iv) uma sequência de aminoácidos que compreende pelo menos uma, duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze, treze ou todas as quatorze modificações de resíduos de aminoácidos na SEQ ID NO: 2, selecionadas do grupo que consiste em: o aminoácido no equivalente da alanina na posição de aminoácido 47 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma fenilalanina; o aminoácido no equivalente da cisteína na posição de aminoácido 97 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma valina; o aminoácido no equivalente da cisteína na posição de aminoácido 97 da SEQ ID NO: 2 é alterado para um ácido glutâmico; o aminoácido no equivalente da treonina na posição de aminoácido 136 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma histidina; o aminoácido no equivalente da asparagina na posição de aminoácido 159 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma valina; o aminoácido no equivalente da asparagina na posição de aminoácido 159 da SEQ ID NO: 2 é alterado para um ácido glutâmico; o aminoácido no equivalente da treonina na posição de aminoácido 163 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma arginina; o aminoácido no equivalente do ácido aspártico na posição de aminoácido 164 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma arginina; o aminoácido no equivalente do ácido glutâmico na posição de aminoácido 168 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma arginina; o aminoácido no

equivalente da glicina na posição de aminoácido 179 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma arginina; o aminoácido no equivalente da cisteína na posição de aminoácido 226 da SEQ ID NO: 2 é alterado para um ácido aspártico; o aminoácido no equivalente da valina na posição de aminoácido 233 da SEQ ID NO: 2 é alterado para um triptofano; o aminoácido no equivalente da glutamina na posição de aminoácido 275 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma valina; o aminoácido no equivalente da arginina na posição de aminoácido 289 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma alanina; o aminoácido no equivalente da treonina na posição de aminoácido 349 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma tirosina; e o aminoácido no equivalente da leucina na posição de aminoácido 363 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma prolina,

em que os ácidos nucleicos codificam pelo menos um polipeptídeo que possui uma atividade de fitase e opcionalmente as identidades de sequência são determinadas através da análise com um algoritmo de comparação de sequências ou através de uma inspeção visual,

e o polipeptídeo possui uma atividade de fitase e opcionalmente a atividade de fitase compreende: a catálise de fitato (mio-inositol-hexafosfato) em inositol e fosfato inorgânico; ou, a hidrólise de fitato (mio-inositol-hexafosfato).

[0021] A invenção fornece polipeptídeos da invenção que possuem atividade de fitase cuja atividade é termotolerante e opcionalmente o polipeptídeo mantém uma atividade de fitase após a exposição a uma temperatura na faixa de aproximadamente -100°C até aproximadamente -80°C, aproximadamente -80°C até aproximadamente -40°C, aproximadamente -40°C até aproximadamente -20°C, aproximadamente -20°C até aproximadamente 0°C, aproximadamente 0°C até

aproximadamente 5°C, aproximadamente 5°C até aproximadamente 15°C, aproximadamente 15°C até aproximadamente 25°C, aproximadamente 25°C até aproximadamente 37°C, aproximadamente 37°C até aproximadamente 45°C, aproximadamente 45°C até aproximadamente 55°C, aproximadamente 55°C até aproximadamente 70°C, aproximadamente 70°C até aproximadamente 75°C, aproximadamente 75°C até aproximadamente 85°C, aproximadamente 85°C até aproximadamente 90°C, aproximadamente 90°C até aproximadamente 95°C, aproximadamente 95°C até aproximadamente 100°C, aproximadamente 100°C até aproximadamente 105°C, aproximadamente 105°C até aproximadamente 110°C, aproximadamente 110°C até aproximadamente 120°C ou 95°C, 96°C, 97°C, 98°C, 99°C, 100°C, 101°C, 102°C, 103°C, 104°C, 105°C, 106°C, 107°C, 108°C, 109°C, 110°C, 111°C, 112°C, 113°C, 114°C, 115°C ou maior. Os polipeptídeos termotolerantes de acordo com a invenção podem manter a atividade, por exemplo, uma atividade de fitase, após a exposição a uma temperatura na faixa de aproximadamente -100°C até aproximadamente -80°C, aproximadamente -80°C até aproximadamente -40°C, aproximadamente -40°C até aproximadamente -20°C, aproximadamente -20°C até aproximadamente 0°C, aproximadamente 0°C até aproximadamente 5°C, aproximadamente 5°C até aproximadamente 15°C, aproximadamente 15°C até aproximadamente 25°C, aproximadamente 25°C até aproximadamente 37°C, aproximadamente 37°C até aproximadamente 45°C, aproximadamente 45°C até aproximadamente 55°C, aproximadamente 55°C até aproximadamente 70°C, aproximadamente 70°C até aproximadamente 75°C, aproximadamente 75°C até aproximadamente 85°C, aproximadamente 85°C até aproximadamente 90°C, aproximadamente 90°C até aproximadamente 95°C, aproximadamente 95°C até aproximadamente 100°C,

aproximadamente 100°C até aproximadamente 105°C, aproximadamente 105°C até aproximadamente 110°C, aproximadamente 110°C até aproximadamente 120°C ou 95°C, 96°C, 97°C, 98°C, 99°C, 100°C, 101°C, 102°C, 103°C, 104°C, 105°C, 106°C, 107°C, 108°C, 109°C, 110°C, 111°C, 112°C, 113°C, 114°C, 115°C ou maior. Em algumas modalidades, os polipeptídeos termotolerantes de acordo com a invenção mantêm a atividade, por exemplo, uma atividade de fitase, após a exposição a uma temperatura nas faixas descritas anteriormente, em aproximadamente pH 3,0, aproximadamente pH 3,5, aproximadamente pH 4,0, aproximadamente pH 4,5, aproximadamente pH 5,0, aproximadamente pH 5,5, aproximadamente pH 6,0, aproximadamente pH 6,5, aproximadamente pH 7,0, aproximadamente pH 7,5, aproximadamente pH 8,0, aproximadamente pH 8,5, aproximadamente pH 9,0, aproximadamente pH 9,5, aproximadamente pH 10,0, aproximadamente pH 10,5, aproximadamente pH 11,0, aproximadamente pH 11,5, aproximadamente pH 12,0 ou maior.

[0022] A invenção fornece polipeptídeos da invenção que possuem atividade de fitase cuja atividade é termoestável. Por exemplo, um polipeptídeo da invenção pode ser termoestável. O polipeptídeo termoestável de acordo com a invenção pode manter a atividade de ligação e/ou enzimática, por exemplo, uma atividade de fitase, sob condições que compreendem uma faixa de temperatura de aproximadamente -100°C até aproximadamente -80°C, aproximadamente -80°C até aproximadamente -40°C, aproximadamente -40°C até aproximadamente -20°C, aproximadamente -20°C até aproximadamente 0°C, aproximadamente 0°C até aproximadamente 37°C, aproximadamente 0°C até aproximadamente 5°C, aproximadamente 5°C até aproximadamente 15°C, aproximadamente 15°C até aproximadamente 25°C, aproximadamente 25°C até

aproximadamente 37°C, aproximadamente 37°C até aproximadamente 45°C, aproximadamente 45°C até aproximadamente 55°C, aproximadamente 55°C até aproximadamente 70°C, aproximadamente 70°C até aproximadamente 75°C, aproximadamente 75°C até aproximadamente 85°C, aproximadamente 85°C até aproximadamente 90°C, aproximadamente 90°C até aproximadamente 95°C, aproximadamente 95°C até aproximadamente 100°C, aproximadamente 100°C até aproximadamente 105°C, aproximadamente 105°C até aproximadamente 110°C, aproximadamente 110°C até aproximadamente 120°C ou 95°C, 96°C, 97°C, 98°C, 99°C, 100°C, 101°C, 102°C, 103°C, 104°C, 105°C, 106°C, 107°C, 108°C, 109°C, 110°C, 111°C, 112°C, 113°C, 114°C, 115°C ou maior. Os polipeptídeos termoestáveis de acordo com a invenção podem manter a atividade, por exemplo, uma atividade de fitase, em temperaturas na faixa de aproximadamente -100°C até aproximadamente -80°C, aproximadamente -80°C até aproximadamente -40°C, aproximadamente -40°C até aproximadamente -20°C, aproximadamente -20°C até aproximadamente 0°C, aproximadamente 0°C até aproximadamente 5°C, aproximadamente 5°C até aproximadamente 15°C, aproximadamente 15°C até aproximadamente 25°C, aproximadamente 25°C até aproximadamente 37°C, aproximadamente 37°C até aproximadamente 45°C, aproximadamente 45°C até aproximadamente 55°C, aproximadamente 55°C até aproximadamente 70°C, aproximadamente 70°C até aproximadamente 75°C, aproximadamente 75°C até aproximadamente 85°C, aproximadamente 85°C até aproximadamente 90°C, aproximadamente 90°C até aproximadamente 95°C, aproximadamente 95°C até aproximadamente 100°C, aproximadamente 100°C até aproximadamente 105°C, aproximadamente 105°C até aproximadamente 110°C, aproximadamente 110°C até aproximadamente

120°C ou 95°C, 96°C, 97°C, 98°C, 99°C, 100°C, 101°C, 102°C, 103°C, 104°C, 105°C, 106°C, 107°C, 108°C, 109°C, 110°C, 111°C, 112°C, 113°C, 114°C, 115°C ou maior. Em algumas modalidades, os polipeptídeos termoestáveis de acordo com a invenção mantêm a atividade, por exemplo, uma atividade de fitase, a uma temperatura nas faixas descritas anteriormente, em aproximadamente pH 3,0, aproximadamente pH 3,5, aproximadamente pH 4,0, aproximadamente pH 4,5, aproximadamente pH 5,0, aproximadamente pH 5,5, aproximadamente pH 6,0, aproximadamente pH 6,5, aproximadamente pH 7,0, aproximadamente pH 7,5, aproximadamente pH 8,0, aproximadamente pH 8,5, aproximadamente pH 9,0, aproximadamente pH 9,5, aproximadamente pH 10,0, aproximadamente pH 10,5, aproximadamente pH 11,0, aproximadamente pH 11,5, aproximadamente pH 12,0 ou maior.

[0023] A invenção fornece polipeptídeos isolados, sintéticos ou recombinantes que compreendem uma sequência de aminoácidos da invenção e (a) que não possuem uma sequência sinal (peptídeo-líder); (b) que não possuem uma sequência sinal (peptídeo-líder) e que compreendem ainda uma sequência sinal heteróloga (peptídeo-líder); (c) a sequência de aminoácidos de (a) ou (b) e que compreendem ainda uma sequência heteróloga, em que opcionalmente a sequência heteróloga compreende um peptídeo de identificação.

[0024] Em um aspecto, a atividade de fitase de qualquer polipeptídeo da invenção compreende (possui) uma atividade específica: a aproximadamente 37°C na faixa de aproximadamente 100 até aproximadamente 1000 unidades por miligrama de proteína; ou, de aproximadamente 500 até aproximadamente 750 unidades por miligrama de proteína; ou, a 37°C na faixa de aproximadamente 500 até aproximadamente

1200 unidades por miligrama de proteína; ou, a 37°C na faixa de aproximadamente 750 até aproximadamente 1000 unidades por miligrama de proteína. Em um aspecto, a atividade de fitase termotolerante compreende uma atividade específica após a exposição a uma temperatura a aproximadamente 37°C na faixa de aproximadamente 100 até aproximadamente 1000 unidades por miligrama de proteína; ou, a atividade de fitase termoestável compreende uma atividade específica de aproximadamente 500 até aproximadamente 750 unidades por miligrama de proteína; ou, a atividade de fitase termoestável compreende uma atividade específica a 37°C na faixa de aproximadamente 500 até aproximadamente 1200 unidades por miligrama de proteína; ou, a atividade de fitase termoestável compreende a atividade específica a 37°C na faixa de aproximadamente 750 até aproximadamente 1000 unidades por miligrama de proteína. Em um aspecto, a atividade de fitase termoestável compreende uma atividade específica sob condições que compreendem uma temperatura de aproximadamente 37°C na faixa de aproximadamente 100 até aproximadamente 1000 unidades por miligrama de proteína; ou, a atividade de fitase termoestável compreende uma atividade específica de aproximadamente 500 até aproximadamente 750 unidades por miligrama de proteína; ou, a atividade de fitase termoestável compreende uma atividade específica a 37°C na faixa de aproximadamente 500 até aproximadamente 1200 unidades por miligrama de proteína; ou, a atividade de fitase termoestável compreende uma atividade específica a 37°C na faixa de aproximadamente 750 até aproximadamente 1000 unidades por miligrama de proteína.

[0025] Em um aspecto, um polipeptídeo da invenção compreende pelo menos um sítio de glicosilação, em que opcionalmente a glicosilação é

uma glicosilação ligada a N ou uma glicosilação ligada a O e opcionalmente o polipeptídeo é glicosilado após ser expresso em uma levedura, que opcionalmente é uma *P. pastoris* ou uma *S. pombe*.

[0026] Em um aspecto, o polipeptídeo mantém uma atividade de fitase sob condições que compreendem aproximadamente pH 6,5, pH 6, pH 5,5, pH 5, pH 4,5, pH 4,0, pH 3,5, pH 3,0 ou pH inferior (mais ácido). Alternativamente, um polipeptídeo da invenção pode manter uma atividade de fitase sob condições que compreendem aproximadamente pH 7,5, pH 8, pH 8,5, pH 9, pH 9,5, pH 10,0, pH 10,5, pH 11,0, pH 11,5, pH 12, pH 12,5 ou pH maior (mais básico).

[0027] A invenção fornece preparações de proteína que compreendem um polipeptídeo da invenção, em que a preparação de proteína compreende um líquido, uma pasta, um pó, um spray, uma suspensão, uma composição/formulação liofilizada, um sólido, geltab, pílula, implante, um gel; ou uma formulação farmacêutica, um alimento, um produto alimentício, um suplemento alimentar, um suplemento para produto alimentício, um aditivo alimentício, um aditivo para produto alimentício, um suplemento nutricional ou um suplemento dietético do mesmo.

[0028] A invenção fornece heterodímeros que compreendem um polipeptídeo da invenção e, em um aspecto, o heterodímero compreende um segundo domínio, em que opcionalmente o segundo domínio é um polipeptídeo e o heterodímero é uma proteína de fusão e opcionalmente o segundo domínio é um epítipo ou uma marcação.

[0029] A invenção fornece polipeptídeos imobilizados que compreendem um polipeptídeo da invenção, em que o polipeptídeo imobilizado pode compreender um homodímero ou um heterodímero da invenção, em que opcionalmente o polipeptídeo é imobilizado sobre ou

dentro de uma célula, uma vesícula, um lipossomo, um filme, uma membrana, um metal, uma resina, um polímero, uma cerâmica, um vidro, um microeletrodo, uma partícula de grafite, uma esfera, um gel, uma placa, um arranjo, um tubo capilar, um cristal, um comprimido, uma pílula, uma cápsula, um pó, um aglomerado, uma superfície ou uma estrutura porosa. Em um aspecto, a invenção fornece arranjos (por exemplo, microarranjos) que compreendem um polipeptídeo imobilizado, em que o polipeptídeo compreende o polipeptídeo da invenção ou o heterodímero da invenção ou o ácido nucleico da invenção ou uma combinação dos mesmos.

[0030] A invenção fornece anticorpos isolados, sintéticos ou recombinantes que se ligam especificamente a um polipeptídeo da invenção ou a um polipeptídeo codificado pelo ácido nucleico da invenção, em que opcionalmente o anticorpo é um anticorpo monoclonal ou um anticorpo policlonal. A invenção fornece hibridomas que compreendem o anticorpo da invenção.

[0031] A invenção fornece métodos de produção de um polipeptídeo recombinante que compreendem as etapas de: (a) fornecimento de um ácido nucleico ligado de forma operacional a um promotor; em que o ácido nucleico compreende uma sequência da invenção; e (b) expressão do ácido nucleico da etapa (a) sob condições que permitem a expressão do polipeptídeo, produzindo assim um polipeptídeo recombinante e opcionalmente o método compreende ainda a transformação de uma célula hospedeira com o ácido nucleico da etapa (a) seguida pela expressão do ácido nucleico da etapa (a), produzindo assim o polipeptídeo recombinante em uma célula hospedeira transformada.

[0032] A invenção fornece métodos para a identificação de um polipeptídeo que possui uma atividade de fitase que compreende as etapas a

seguir: (a) fornecimento do polipeptídeo da invenção; (b) fornecimento de um substrato da fitase; e (c) contato do polipeptídeo ou de um fragmento ou de uma variação do mesmo da etapa (a) com o substrato da etapa (b) e detecção de um aumento na quantidade de substrato ou de um decréscimo na quantidade do produto de reação, em que um decréscimo na quantidade do substrato ou um aumento na quantidade do produto de reação detecta um polipeptídeo que possui uma atividade de fitase.

[0033] A invenção fornece métodos para a identificação de um substrato da fitase que compreendem as etapas a seguir: (a) fornecimento do polipeptídeo da invenção; (b) fornecimento de um substrato de teste; e (c) contato do polipeptídeo da etapa (a) com o substrato de teste da etapa (b) e detecção de um aumento na quantidade de substrato ou de um decréscimo na quantidade de produto de reação, em que um decréscimo na quantidade do substrato ou um aumento na quantidade do produto de reação identifica o substrato de teste como um substrato da fitase.

[0034] A invenção fornece métodos de determinação do fato de um composto se ligar especificamente a um polipeptídeo que compreende as etapas a seguir: (a) expressão de um ácido nucleico ou de um vetor que compreende o ácido nucleico sob condições permissivas para a tradução do ácido nucleico em um polipeptídeo, em que o ácido nucleico compreende uma sequência da invenção; (b) contato do polipeptídeo com o composto de teste; e (c) determinação do fato do composto de teste se ligar especificamente ao polipeptídeo, determinando assim que o composto se liga especificamente ao polipeptídeo.

[0035] A invenção fornece métodos para a identificação de um modulador de uma atividade de fitase que compreende as etapas a seguir: (a) fornecimento do polipeptídeo da fitase da invenção; (b) fornecimento de um

composto de teste; (c) contato do polipeptídeo da etapa (a) com o composto de teste da etapa (b) e medida de uma atividade de fitase, em que uma alteração na atividade de fitase medida na presença do composto de teste comparada com a atividade na ausência do composto de teste fornece uma determinação de que o composto de teste modula a atividade de fitase, em que opcionalmente a atividade de fitase é medida pelo fornecimento de um substrato da fitase e pela detecção de um aumento na quantidade do substrato ou de um decréscimo na quantidade de um produto de reação e opcionalmente um decréscimo na quantidade do substrato ou um aumento na quantidade do produto de reação com o composto de teste quando comparada com a quantidade de substrato ou de produto de reação sem o composto de teste identifica o composto de teste como um ativador da atividade de fitase e opcionalmente um aumento na quantidade do substrato ou um decréscimo na quantidade do produto de reação com o composto de teste quando comparada com a quantidade de substrato ou de produto de reação sem o composto de teste identifica o composto de teste como um inibidor da atividade de fitase.

[0036] A invenção fornece sistemas de computador que compreendem um processador e um dispositivo de armazenamento de dados em que o dito dispositivo de armazenamento de dados possui gravado no mesmo uma sequência de polipeptídeo ou uma sequência de ácido nucleico, em que a sequência de polipeptídeo compreende uma sequência da invenção e o ácido nucleico compreende uma sequência da invenção e opcionalmente o método compreende ainda um algoritmo de comparação de sequências e um dispositivo de armazenamento de dados possuindo pelo menos uma sequência de referência gravada no mesmo e opcionalmente o algoritmo de comparação de sequências compreende um programa de computador que

indica polimorfismos e opcionalmente o método compreende ainda um identificador que identifica uma ou mais características na dita sequência. A invenção fornece um meio que pode ser lido pelo computador (media) que possui armazenado no mesmo uma sequência de polipeptídeo ou uma sequência de ácido nucleico, em que a sequência de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácidos da invenção e o ácido nucleico compreende uma sequência da invenção. A invenção fornece métodos para a identificação de uma característica em uma sequência que compreende as etapas de: (a) leitura da sequência utilizando um programa de computador que identifica uma ou mais características em uma sequência, em que a sequência compreende uma sequência de polipeptídeo ou uma sequência de ácido nucleico, em que a sequência de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácidos da invenção e o ácido nucleico compreende uma sequência da invenção; e, (b) identificação de uma ou mais características na sequência com o programa de computador. A invenção fornece métodos para a comparação de uma primeira sequência com uma segunda sequência que compreendem as etapas de: (a) leitura da primeira sequência e da segunda sequência através do uso de um programa de computador que compara as sequências, em que a primeira sequência compreende uma sequência de polipeptídeo ou uma sequência de ácido nucleico, em que a sequência de polipeptídeo compreende a sequência de aminoácidos da invenção e o ácido nucleico compreende a sequência da invenção; e, (b) determinação das diferenças entre a primeira sequência e a segunda sequência com o programa de computador, em que opcionalmente a etapa de determinação das diferenças entre a primeira sequência e a segunda sequência compreende ainda a etapa de identificação de polimorfismos e opcionalmente o método compreende ainda um identificador que identifica uma ou mais

características em uma sequência e opcionalmente o método compreende a leitura da primeira sequência utilizando um programa de computador e a identificação de uma ou mais características na sequência.

[0037] A invenção fornece métodos para a hidrólise de um inositol-hexafosfato em inositol e fosfato inorgânico que compreendem as etapas a seguir: (a) fornecimento de um polipeptídeo que possui uma atividade de fitase, em que o polipeptídeo compreende a sequência de aminoácidos da invenção ou, um polipeptídeo codificado pelo ácido nucleico da invenção; (b) fornecimento de uma composição que compreende um inositol-hexafosfato; e (c) contato do polipeptídeo da etapa (a) com a composição da etapa (b) sob condições em que o polipeptídeo hidrolisa o inositol-hexafosfato para produzir inositol e fosfato inorgânico, em que opcionalmente as condições compreendem uma temperatura entre aproximadamente 37oC e aproximadamente 70oC, entre aproximadamente 50oC e aproximadamente 80oC ou entre aproximadamente 60oC e aproximadamente 90oC e opcionalmente a composição compreende um ácido fítico.

[0038] A invenção fornece métodos para a eliminação de goma de óleos que compreendem as etapas a seguir: (a) fornecimento de um polipeptídeo que possui uma atividade de fitase, em que o polipeptídeo compreende a sequência de aminoácidos da invenção ou, um polipeptídeo codificado pelo ácido nucleico da invenção; (b) fornecimento de uma composição que compreende um óleo vegetal; e (c) contato do polipeptídeo da etapa (a) e o óleo vegetal da etapa (b) sob condições em que o polipeptídeo pode clivar uma ligação de inositol-fosfato inorgânico, eliminando assim a goma do óleo vegetal.

[0039] A invenção fornece métodos para a produção de um produto

alimentício ou um alimento ou um suplemento para produto alimentício ou alimento ou um aditivo para alimento ou produto alimentício ou um suplemento nutricional ou um suplemento dietético, que compreendem as etapas a seguir: (a) transformação de uma planta, de uma parte de planta ou de uma célula vegetal com um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da enzima fitase, em que a fitase compreende um polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácidos da invenção ou, um polipeptídeo codificado pelo ácido nucleico da invenção; (b) cultivo da planta, da parte da planta ou da célula vegetal sob condições em que a enzima fitase é expressa; e, (c) conversão da planta, das partes da planta ou da célula vegetal em uma composição adequada para um alimento, um produto alimentício, um suplemento para alimento, um suplemento para produto alimentício, um aditivo para alimento, um aditivo para produto alimentício, um suplemento nutricional ou um suplemento dietético ou adição da planta cultivada, da parte da planta ou da célula vegetal a um alimento, um produto alimentício, um suplemento para alimento, um suplemento para produto alimentício, um aditivo para alimento, um aditivo para produto alimentício, um suplemento nutricional ou um suplemento dietético, produzindo assim um alimento, um produto alimentício, um suplemento para alimento, um suplemento para produto alimentício, um aditivo para alimento, um aditivo para produto alimentício, um suplemento nutricional ou um suplemento dietético, em que opcionalmente o polinucleotídeo está contido em um vetor de expressão e opcionalmente o vetor compreende uma sequência de controle da expressão capaz de expressar o ácido nucleico em uma célula vegetal e opcionalmente o alimento, o produto alimentício, o suplemento para alimento, o suplemento para produto alimentício, o aditivo para alimento, o aditivo para produto alimentício, o suplemento nutricional ou o suplemento dietético é para um

animal e opcionalmente em que o animal é um animal monogástrico e opcionalmente o animal é um ruminante e opcionalmente o alimento, o produto alimentício, o suplemento para alimento, o suplemento para produto alimentício, o aditivo para alimento, o aditivo para produto alimentício, o suplemento nutricional ou o suplemento dietético, está na forma de uma matriz de fornecimento, um pélete, um comprimido, um gel, um líquido, um spray, grão moído ou um pó. Em um aspecto, a enzima fitase é glicosilada para fornecer termotolerância ou termostabilidade nas condições de peletização e opcionalmente a matriz de fornecimento é formada através da peletização de uma mistura que compreende um germen de grão e a enzima fitase para produzir uma partícula e opcionalmente os péletes são produzidos sob condições que compreendem a aplicação de vapor, opcionalmente os péletes são produzidos sob condições que compreendem a aplicação de uma temperatura em excesso de 80°C durante aproximadamente 5 minutos e opcionalmente o pélete compreende uma enzima fitase que compreende uma atividade específica de pelo menos 350 até aproximadamente 900 unidades por miligrama de enzima.

[0040] A invenção fornece métodos para o fornecimento de um suplemento de enzima fitase para um animal ou um ser humano, o dito método compreendendo: (a) a preparação de uma matriz de fornecimento comestível que compreende um veículo comestível e uma enzima fitase que compreende um polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácidos da invenção, em que a matriz é rapidamente dispersa e libera a enzima fitase quando colocada em meio aquoso e, (b) a administração da matriz de fornecimento de enzima comestível ao animal ou ao ser humano, em que opcionalmente a matriz de fornecimento comestível compreende um veículo comestível granulado e opcionalmente a matriz de fornecimento comestível

está na forma de péletes, comprimidos, géis, líquidos, sprays ou pós e opcionalmente o veículo comestível compreende um veículo selecionado do grupo que consiste em gérmen de grão, feno, alfalfa, campim rabo de rato, casca de soja, farinha grossa de semente de girassol, farinha grossa de milho, farinha grossa de soja e farinha grossa de trigo e opcionalmente o veículo comestível compreende gérmen de grão que está esgotado de óleo.

[0041] A invenção fornece um alimento, um produto alimentício, um suplemento para alimento, um suplemento para produto alimentício, um aditivo para alimento, um aditivo para produto alimentício, um suplemento nutricional ou um suplemento dietético, para um animal ou um ser humano, que compreende o polipeptídeo da invenção ou um homodímero ou um heterodímero da invenção; em que opcionalmente o polipeptídeo é glicosilado e opcionalmente a atividade de fitase é termotolerante ou termoestável. Em um aspecto, o alimento, o produto alimentício, o suplemento para alimento, o suplemento para produto alimentício, o aditivo para alimento, o aditivo para produto alimentício, o suplemento nutricional ou o suplemento dietético é produzido em pélete, pílula, comprimido, cápsula, gel, gellab, spray, pó, formulação liofilizada, formulação farmacêutica, forma líquida, na forma de uma suspensão ou uma pasta fluida ou produzido utilizando aditivos revestidos com polímeros ou produzido na forma de granulado ou produzido através de secagem por atomização.

[0042] A invenção fornece uma matriz de fornecimento de enzima comestível ou que pode ser absorvida (matrizes) que compreende o polipeptídeo da invenção ou um homodímero ou um heterodímero da invenção; em que opcionalmente o polipeptídeo é glicosilado e opcionalmente a atividade de fitase é termotolerante ou termoestável. Em um aspecto, a matriz de fornecimento comestível compreende um pélete ou

a matriz de fornecimento de enzima comestível ou que pode ser absorvida é produzida em pélete, pílula, comprimido, cápsula, gel, geltab, spray, pó, formulação liofilizada, formulação farmacêutica, na forma líquida, na forma de uma suspensão ou uma pasta fluida ou produzida utilizando aditivos revestidos com polímeros ou produzida na forma de granulado ou produzida através de secagem por atomização.

[0043] A invenção fornece péletes comestíveis ou que podem ser absorvidos que compreendem um veículo granulado comestível ou que podem ser absorvidos e o polipeptídeo da invenção ou um homodímero ou um heterodímero da invenção; em que opcionalmente o polipeptídeo é glicosilado e opcionalmente a atividade de fitase é termotolerante ou termoestável e opcionalmente o pélete é produzido na forma de pélete ou na forma de uma pílula, um comprimido, uma cápsula, um gel, um geltab, um spray, um pó, uma formulação liofilizada, uma formulação farmacêutica, uma forma de líquido, na forma de uma suspensão ou uma pasta fluida ou produzida utilizando aditivos revestidos por polímeros ou produzida na forma granulada ou produzida através de secagem por atomização.

[0044] A invenção fornece farinhas grossas, por exemplo, uma farinha grossa de soja, que compreende um polipeptídeo da invenção ou um homodímero ou um heterodímero da invenção e opcionalmente a farinha grossa, por exemplo, a farinha grossa de soja, é produzida na forma de um pélete, uma pílula, um comprimido, uma cápsula, um gel, um geltab, um spray, um pó, uma formulação liofilizada ou uma forma líquida.

[0045] A invenção fornece métodos de aumento da resistência de um polipeptídeo de fitase à inativação enzimática em um sistema digestivo de um animal, o método compreendendo a glicosilação de um polipeptídeo da fitase que compreende o polipeptídeo da invenção, aumentando assim a

resistência do polipeptídeo da fitase à inativação enzimática em um sistema digestivo de um animal e opcionalmente a glicosilação é uma glicosilação ligada a N e opcionalmente o polipeptídeo da fitase é glicosilado como um resultado da expressão in vivo de um polinucleotídeo que codifica a fitase em uma célula e opcionalmente a célula é uma célula eucariótica e opcionalmente a célula eucariótica é uma célula de fungo, uma célula vegetal ou uma célula de mamífero.

[0046] A invenção fornece métodos para o processamento de grãos de milho e de sorgo que compreendem as etapas a seguir: (a) fornecimento de um polipeptídeo que possui uma atividade de fitase, em que o polipeptídeo compreende o polipeptídeo da invenção; (b) fornecimento de uma composição que compreende um líquido de infusão de milho ou um líquido de infusão de sorgo; e (c) contato do polipeptídeo da etapa (a) e a composição da etapa (b) sob condições em que o polipeptídeo pode clivar uma ligação de inositol-fosfato inorgânico.

[0047] A invenção fornece produtos farmacêuticos ou formulações dietéticas que compreendem um polipeptídeo ou um heterodímero da invenção; em que opcionalmente o polipeptídeo é glicosilado e opcionalmente a atividade de fitase é termotolerante ou termoestável; e opcionalmente o produto farmacêutico ou uma formulação dietética é obtida na forma de pélete, pílula, comprimido, cápsula, geltab, spray, pó, loção ou na forma líquida ou produzida utilizando aditivos revestidos por polímeros ou na forma de um implante ou produzida na forma granulada ou produzida através de secagem por atomização.

[0048] A invenção fornece composições que compreendem um polipeptídeo ou um heterodímero da invenção; e, (b) qualquer produto que é apresentado na Tabela 2 ou qualquer uma das composições listadas na

Tabela 1; em que opcionalmente o polipeptídeo é glicosilado e opcionalmente a atividade de fitase é termotolerante ou termoestável.

[0049] A invenção fornece uma unidade Pronta para Consumo (MRE) de farinha grossa autocontida, uma bebida ou um agente de hidratação que compreende um polipeptídeo ou um heterodímero da invenção; em que opcionalmente o polipeptídeo é glicosilado e opcionalmente a atividade de fitase é termotolerante ou termoestável.

[0050] A invenção fornece métodos para melhorar (retardar o progresso de, tratar ou prevenir) a osteoporose que compreendem a administração a um indivíduo que necessita dos mesmos de uma quantidade eficiente (dosagem) de uma composição que compreende um polipeptídeo ou um heterodímero da invenção; em que opcionalmente o polipeptídeo é glicosilado e opcionalmente a atividade de fitase é termotolerante ou termoestável.

[0051] Os detalhes de um ou mais aspectos da invenção são apresentados nas figuras em anexo e na descrição a seguir. Outras características, objetivos e vantagens da invenção serão evidentes partindo da descrição e das figuras e das reivindicações.

[0052] Todas as publicações, as patentes, os pedidos de patentes, as sequências do GenBank e os depósitos na ATCC, citados aqui são explicitamente incorporados aqui como referência para todas as finalidades.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0053] As figuras a seguir são ilustrativas dos aspectos da invenção e não são entendidas como limitantes do âmbito da invenção que é abrangido pelas reivindicações.

[0054] A Figura 1 é um diagrama em blocos de um sistema de computador, como descrito em detalhes, a seguir.

[0055] A Figura 2 é um diagrama de fluxo que ilustra um aspecto de um processo 200 para a comparação de uma nova sequência de nucleotídeos ou de proteína com um banco de dados de sequências para determinar os níveis de homologia entre a nova sequência e as sequências no banco de dados, como descrito em detalhes, a seguir.

[0056] A Figura 3 é um diagrama de fluxo que ilustra uma modalidade de um processo em um computador para determinar se duas sequências são homólogas, como descrito em detalhes, a seguir.

[0057] A Figura 4 é um diagrama de fluxo que ilustra um aspecto de um processo de identificação para a detecção da presença de uma característica em uma sequência, como descrito em detalhes, a seguir.

[0058] A Figura 5 ilustra um resumo da atividade residual de polipeptídeos purificados da invenção, exemplos de sequências com uma única mutação da invenção, após tratamento térmico a várias temperaturas durante 30 minutos; em que a atividade de fitase é analisada com um substrato fluorescente e as taxas foram comparadas com as taxas de cada amostra não tratada correspondente; como descrito em detalhes no Exemplo 1, a seguir.

[0059] A Figura 6 ilustra um resumo da atividade residual de polipeptídeos purificados da invenção que compreendem mutações de resíduos isolados "mescladas" (fitases que contêm várias mutações), após tratamento térmico em um termociclador; em que a atividade de fitase é analisada com um substrato fluorescente e as taxas foram comparadas com as taxas de cada amostra não-tratada correspondente; que é resumido na Figura 6; como descrito em detalhes no Exemplo 1, a seguir.

[0060] A Figura 7 resume graficamente os dados utilizados para gerar o gráfico da Figura 6; como descrito em detalhes no Exemplo 1, a

seguir.

[0061] A Figura 8 ilustra a sequência da fitase original SEQ ID NO: 2 e as modificações de sequência geradas pela mutagênese por saturação do sítio gênico (GSSM) selecionadas para a construção da biblioteca GeneReassembly®; como descrito em detalhes, a seguir.

[0062] A Figura 9 ilustra exemplos de fitases que possuem várias modificações de resíduos na SEQ ID NO: 2 original; como descrito em detalhes aqui.

[0063] A Figura 10 ilustra exemplos de fitases que possuem modificações de resíduos isolados na SEQ ID NO: 2 original; como descrito em detalhes aqui.

[0064] A Figura 11 ilustra esquematicamente um exemplo de ensaio de fitase da invenção utilizando o substrato fluorescente fosfato de 4-metilumbelliferila (MeUMB-fosfato); como descrito em detalhes no Exemplo 1, a seguir.

[0065] A Figura 12 ilustra esquematicamente um exemplo de ensaio de fitase da invenção que utiliza o substrato fluorescente MeUMB-fosfato; como descrito em detalhes no Exemplo 1, a seguir.

[0066] A Figura 13 ilustra esquematicamente o protocolo para um exemplo de classificação de biblioteca, como descrito na Figura 12, como descrito em detalhes no Exemplo 1, a seguir.

[0067] A Figura 14 ilustra um exemplo de processo alcoólico que pode incorporar o uso de fitases desta invenção.

[0068] Símbolos de referência similares nas várias figuras indicam elementos similares.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0069] A invenção refere-se a polipeptídeos de fitase que possuem

as modificações de resíduos específicos na SEQ ID NO: 2, como descrito anteriormente e polinucleotídeos que codificam os mesmos, (por exemplo, que compreendem as modificações de pares de bases específicas na SEQ ID NO: 1, como descrito anteriormente), assim como a métodos de uso dos polinucleotídeos e dos polipeptídeos. A Figura 10 ilustra exemplos de fitases que possuem modificações de resíduos isolados na SEQ ID NO: 2 original e a Figura 9 ilustra exemplos de fitases que possuem modificações de vários resíduos na SEQ ID NO: 2 original.

[0070] A atividade de fitase dos polipeptídeos da invenção pode abranger enzimas que possuem qualquer atividade de fitase, por exemplo, enzimas capazes de catalisar a degradação de fitato, por exemplo, a catálise de fitato (mio-inositol-hexafosfato) em inositol e fosfato inorgânico. As fitases da invenção incluem enzimas termotolerantes e termorresistentes.

[0071] As fitases e os polinucleotídeos que codificam as fitases da invenção são úteis em um número de processos, métodos e composições. Por exemplo, como discutido anteriormente, uma fitase pode ser utilizada em um produto alimentício para animais e em suplementos para produtos alimentícios assim como em tratamentos para degradar ou remover o excesso de fitato do ambiente ou de uma amostra. Outros usos serão evidentes aos versados na técnica com base nos ensinamentos fornecidos aqui, incluindo os discutidos anteriormente.

[0072] Em um aspecto, as moléculas de fitase da invenção – isoladamente ou em combinação com outros reagentes (incluindo, mas não-limitados a enzimas, tais como proteases, amilases e similares) – são utilizadas no processamento de matérias alimentícias, por exemplo, para a prevenção da formação de lama de milho indesejável e em outras aplicações em que a hidrólise do fitato é desejável.

[0073] Em um aspecto, as moléculas de fitase da invenção são utilizadas para eliminar ou diminuir a presença de fitato não-hidrolisado, especialmente quando o fitato não-hidrolisado leva a consequências problemáticas em processos ex vivo que incluem – mas não-estão limitados a – o processamento de matérias alimentícias. Em um aspecto, as moléculas de fitase da invenção são utilizadas em procedimentos que são descritos na EP0321004-B1 (Vaara e outros), incluindo etapas no processamento de grãos de milho e de sorgo através do qual os grãos duros são imersos em água para amolecê-los. As substâncias solúveis em água que são lixiviadas durante este processo se tornam parte de um licor de infusão do milho, que é concentrado por evaporação. O ácido fítico não-hidrolisado no líquido de infusão do milho, basicamente na forma de sais de cálcio e magnésio, está associado com fósforo e se deposita na forma de uma lama indesejável com proteínas e íons metálicos. Esta lama é problemática na evaporação, no transporte e no armazenamento do líquido de infusão do milho. As moléculas de fitase da invenção são utilizadas para hidrolisar esta lama.

[0074] Em um aspecto, as fitases da invenção podem fornecer desempenho comercial substancialmente superior ao das moléculas de fitase identificadas anteriormente, por exemplo, moléculas de fitase de origem fúngica. Em um aspecto, as enzimas da invenção podem ter aproximadamente 4400 U/mg ou mais que aproximadamente entre 50 até 100 ou 50 até 1000 ou 100 até 4000 U/mg de proteína.

[0075] A invenção fornece ainda métodos para modificar as características de uma fitase da invenção através da mutagênese e outro método, como discutido em detalhes, a seguir.

Produção e Manipulação de Ácidos Nucleicos

[0076] A invenção fornece ácidos nucleicos que codificam os

polipeptídeos e as fitases da invenção. A invenção fornece ainda cassetes de expressão, vetores tais como vetores de expressão ou de clonagem, veículos de clonagem tal como um vetor viral, um plasmídeo, um fago, um fagemídeo, um cosmídeo, um foscídeo, um bacteriófago ou um cromossomo artificial, que pode compreender ou que pode possuir contido no mesmo, um ácido nucleico da invenção.

[0077] A invenção inclui ainda métodos para a descoberta de novas sequências de fitases utilizando os ácidos nucleicos da invenção. São também fornecidos para a modificação dos ácidos nucleicos da invenção, por exemplo, através da remontagem por ligação sintética, do sistema de evolução direcionada otimizada e/ou da mutagênese por saturação.

[0078] Em um aspecto, a invenção fornece um gênero de ácidos nucleicos que são variações geradas sinteticamente da SEQ ID NO: 1 original, em que estes ácidos nucleicos da invenção possuem pelo menos 95%, 96% 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 1 "original" e compreendem pelo menos uma, duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze, treze ou todas as quatorze modificações de sequências de pares de bases de nucleotídeos na SEQ ID NO: 1, que são apresentadas anteriormente. Para referência, a SEQ ID NO: 1 original é:

```

          atgaaagcga  tcttaatccc  atttttatct  cttctgattc  cgttaacccc
gcaatctgca  60
          ttcgctcaga  gtgagccgga  gctgaagctg  gaaagtgtgg  tgattgtcag
tcgtcatggt  120
          gtgcgtgctc  caaccaaggc  cacgcaactg  atgcaggatg  tcaccccaga
cgcatggcca  180
          acctggccgg  taaaactggg  tgagctgaca  ccgcgcgggtg  gtgagctaata

```

cgcctatctc 240
 ggacattact ggcgtcagcg tctggtagcc gacggattgc tgcctaaatg
 tggctgcccc 300
 cagtctggtc aggtcgcgat tattgctgat gtcgacgagc gtacccgtaa
 aacaggcgaa 360
 gccttcgccg ccgggctggc acctgactgt gcaataaccg tacataccca
 ggcagatacg 420
 tccagtcccc atccgttatt taatcctcta aaaactggcg tttgccaact
 ggataacgcg 480
 aacgtgactg acgcgatcct cgagagggca ggagggtcaa ttgctgactt
 taccgggcat 540
 tatcaaacgg cgtttcgcga actggaacgg gtgcttaatt ttccgcaatc
 aaacttgtgc 600
 cttaaactgt agaaacagga cgaaagctgt tcattaacgc aggcattacc
 atcggaactc 660
 aaggtgagcg ccgactgtgt ctcattaacc ggtgcggtaa gcctcgcac
 aatgctgacg 720
 gagatatttc tcctgcaaca agcacaggga atgccggagc cggggtgggg
 aaggatcacc 780
 gattcacacc agtggaacac cttgctaagt ttgcataacg cgcaatttga
 tttgctacaa 840
 cgcacgccag aggttgcccc cagccgcgcc accccgttat tagatttgat
 caagacagcg 900
 ttgacgcccc atccaccgca aaaacaggcg tatgggtgtga cattaccac
 ttcagtgtg 960
 tttatcgccg gacacgatac taatctggca aatctcggcg gcgcaactgga
 gctcaactgg 1020

acgcttcccg gtcagccgga taacacgccg ccaggtggtg aactggtgtt
tgaacgctgg 1080

cgtcggctaa gcgataacag ccagtggatt caggtttcgc tggtttcca
gactttacag 1140

cagatgctg ataaaacgcc gctgtcatta aatacgccgc ccggagaggt
gaaactgacc 1200

ctggcaggat gtgaagagcg aaatgcgcag ggcatgtgtt cgttggcagg
ttttacgcaa 1260

atcgtgaatg aagcacgcat accggcgtgc agtttgtaa
1299

Os ácidos nucleicos da invenção podem ser produzidos, isolados e/ou manipulados, por exemplo, através da clonagem e da expressão de bibliotecas de cDNA, da amplificação de mensagem ou do DNA genômico por PCR e similares. Na prática dos métodos da invenção, genes homólogos podem ser modificados através da manipulação de um ácido nucleico molde, como descrito aqui. A invenção pode ser praticada em associação com qualquer método ou protocolo ou dispositivo conhecido na técnica, que é bem descrito na literatura científica e de patentes.

Técnicas Gerais

[0079] Os ácidos nucleicos utilizados para a prática desta invenção, seja RNA, iRNA, ácido nucleico antissenso, cDNA, DNA genômico, vetores, vírus ou híbridos dos mesmos, podem ser isolados partindo de uma variedade de fontes, engenheirados geneticamente, amplificados e/ou expressos/gerados de forma recombinante. Os polipeptídeos recombinantes gerados partindo destes ácidos nucleicos podem ser isolados ou clonados individualmente e testados em relação a uma atividade desejada. Qualquer sistema de expressão recombinante pode ser utilizado, incluindo sistemas de

expressão bacterianos, de mamífero, de levedura, de inseto ou de célula vegetal.

[0080] Alternativamente, estes ácidos nucleicos podem ser sintetizados in vitro através de técnicas de síntese química bem conhecidas, que são descritas, por exemplo, em Adams (1983) J. Am. Chem. Soc. 105:661; Belousov (1997) Nucleic Acids Res. 25:3440-3444; Frenkel (1995) Free Radic. Biol. Med. 19:373-380; Blommers (1994) Biochemistry 33:7886-7896; Narang (1979) Meth. Enzymol. 68:90; Brown (1979) Meth. Enzymol. 68:109; Beaucage (1981) Tetra. Lett. 22:1859; Patente U.S. No 4.458.066.

[0081] As técnicas para a manipulação de ácidos nucleicos, tais como, por exemplo, subclonagem, sondas de marcação (por exemplo, marcação com iniciadores aleatórios utilizando polimerase de Klenow, tradução por cortes ("nick translation"), amplificação), sequenciamento, hibridização e similares são bem conhecidas na literatura científica e de patentes, ver, por exemplo, Sambrook, ed., Molecular Cloning: a Laboratory Manual (2ª ed.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989); Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, ed. John Wiley & Sons, Inc., Nova York (1997); Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hibridization With Nucleic Acid Probes, Parte I. Theory and Nucleic Acid Preparation, Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993).

[0082] Um outro meio útil de obtenção e de manipulação de ácidos nucleicos utilizados para a prática dos métodos da invenção é a clonagem partindo de amostras genômicas e, se desejado, a classificação e a reclonagem de insertos isolados ou amplificados, por exemplo, de clones genômicos ou de clones de cDNA. As fontes de ácido nucleico utilizadas nos métodos da invenção incluem bibliotecas genômicas ou de cDNA

contidas, por exemplo, em cromossomos artificiais de mamífero (MACs), ver, por exemplo, as Patentes U.S. Nos 5.721.118; 6.025.155; cromossomos artificiais humanos, ver, por exemplo, Rosenfeld (1997) *Nat. Genet.* 15:333-335; cromossomos artificiais de levedura (YAC); cromossomos artificiais de bactéria (BAC); cromossomos artificiais de P1, ver, por exemplo, Woon (1998) *Genomics* 50:306-316; vetores derivados de P1 (PACs), ver, por exemplo, Kern (1997) *Biotechniques* 23:120-124; cosmídeos, vírus recombinantes, fagos ou plasmídeos.

[0083] Em aspectos alternativos, as expressões "ácido nucleico" ou "sequência de ácido nucleico" referem-se a um oligonucleotídeo, um nucleotídeo, um polinucleotídeo ou a um fragmento de qualquer um destes, a um DNA ou um RNA (por exemplo, mRNA, rRNA, tRNA) de origem genômica ou sintética que pode ter fita simples ou fita dupla e pode representar um fita senso ou antissenso, a um ácido nucleico peptídico (PNA) ou a qualquer material similar a DNA ou similar a RNA, de origem natural ou sintética, incluindo, por exemplo, iRNA, ribonucleoproteínas (por exemplo, iRNPs). O termo abrange ácidos nucleicos, isto é, oligonucleotídeos, que contêm análogos conhecidos de nucleotídeos naturais. O termo abrange ainda estruturas similares a ácidos nucleicos com estruturas sintéticas, ver, por exemplo, Mata (1997) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 144:189-197; Strauss-Soukup (1997) *Biochemistry* 36:8692-8698; Samstag (1996) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 6:153-156.

[0084] Em um aspecto, os polinucleotídeos recombinantes da invenção compreendem sequências adjacentes a um ácido nucleico "estrutural" ao qual não-estão adjacentes em seu ambiente natural. Em um aspecto, os ácidos nucleicos representam 5% ou mais do número de insertos de ácidos nucleicos em uma população de "moléculas estruturais" de ácidos

nucleicos. "Moléculas estruturais" de acordo com a invenção incluem ácidos nucleicos tais como vetores de expressão, ácidos nucleicos auto replicantes, vírus, ácidos nucleicos de integração e outros vetores ou ácidos nucleicos utilizados para manter ou manipular um inserto de ácido nucleico de interesse. Em um aspecto, os ácidos nucleicos enriquecidos representam 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou mais do número de insertos de ácidos nucleicos na população de moléculas estruturais recombinantes.

[0085] Em um aspecto, um ácido nucleico que codifica um polipeptídeo da invenção é montado em fase apropriada com uma sequência-líder capaz de direcionar a secreção do polipeptídeo traduzido ou de um fragmento do mesmo.

[0086] A invenção fornece proteínas de fusão e ácidos nucleicos que codificam as mesmas. Um polipeptídeo da invenção pode ser fundido a um peptídeo ou um polipeptídeo heterólogo, tal como peptídeos de identificação N-terminais que conferem características desejadas, tal como maior estabilidade ou purificação simplificada. Os peptídeos e os polipeptídeos da invenção também podem ser sintetizados e expressos na forma de proteínas de fusão com um ou mais domínios adicionais ligados às mesmas para, por exemplo, produzir um peptídeo mais imunogênico, para isolar mais facilmente um peptídeo sintetizado de forma recombinante, para identificar e isolar anticorpos e células B que expressam anticorpos e similares. A detecção e a purificação que facilitam os domínios incluem, por exemplo, peptídeos que quelam metais tais como regiões de poli-histidina e módulos de histidina-triptofano que permitem a purificação sobre metais imobilizados, domínios da proteína A que permitem a purificação sobre imunoglobulina imobilizada e o domínio utilizado no sistema de purificação

por extensão/afinidade por FLAGS (Immunex Corp, Seattle WA). A inclusão de sequências ligantes que podem ser clivadas tal como o Fator Xa ou a enteroquinase (Invitrogen, San Diego CA) entre um domínio de purificação e o peptídeo ou o polipeptídeo que compreende o motivo para facilitar a purificação. Por exemplo, um vetor de expressão pode incluir uma sequência de ácido nucleico que codifica um epitopo ligada a seis resíduos de histidina seguida por uma tiorredoxina e um sítio de clivagem de enteroquinase (ver, por exemplo, Williams (1995) *Biochemistry* 34:1787-1797; Dobeli (1998) *Protein Expr. Purif.* 12:404-414). Os resíduos de histidina facilitam a detecção e a purificação enquanto que o sítio de clivagem da enteroquinase fornece um meio para a purificação do epitopo do restante da proteína de fusão. A tecnologia relacionada aos vetores que codificam proteínas de fusão e à aplicação de proteínas de fusão é bem descrita na literatura científica e de patentes, ver, por exemplo, Kroll (1993) *DNA Cell. Biol.*, 12:441-53.

[0087] Em um aspecto, o termo "isolado" significa que o material é removido de seu ambiente original (por exemplo, do ambiente natural se ocorrer naturalmente). Por exemplo, um polinucleotídeo ou um polipeptídeo que ocorre naturalmente presente em um animal vivo não é isolado, mas o mesmo polinucleotídeo ou polipeptídeo, separado de parte ou de todos os materiais coexistentes no sistema natural, é isolado. Tais polinucleotídeos poderiam fazer parte de um vetor e/ou tais polinucleotídeos ou polipeptídeos poderiam fazer parte de uma composição e ainda ser isolados de forma que tal vetor ou composição não fizesse parte de seu ambiente natural. Em um aspecto, o termo "purificado" não requer pureza absoluta; ao invés disso, este é pretendido como uma definição relativa. Os ácidos nucleicos individuais obtidos partindo de uma biblioteca foram purificados de forma

convencional até a homogeneidade eletroforética. As sequências obtidas partindo destes clones poderiam não ser obtidas diretamente partindo da biblioteca ou do DNA humano total. Os ácidos nucleicos purificados da invenção foram purificados partindo do restante do DNA genômico no organismo em pelo menos 10⁴-10⁶ vezes. Em aspectos alternativos, o termo "purificado" inclui ainda ácidos nucleicos que foram purificados do restante do DNA genômico ou de outras sequências em uma biblioteca ou outro ambiente em pelo menos uma ordem de grandeza ou alternativamente, duas ou três ordens ou quatro ou cinco ordens de grandeza.

Sequências de controle da transcrição e da tradução

[0088] A invenção fornece sequências de ácidos nucleicos (por exemplo, DNA) da invenção ligadas de forma operacional a sequência(s) de controle da expressão (por exemplo, da transcrição ou da tradução), por exemplo, promotores ou intensificadores, para direcionar ou modular a síntese/expressão de RNA. A sequência de controle da expressão pode estar em um vetor de expressão. Os exemplos de promotores bacterianos incluem lacI, lacZ, T3, T7, gpt, lambda PR, PL e trp. Os exemplos de promotores eucarióticos incluem o inicial imediato do CMV, o da timidina quinase do HSV, o do SV40 inicial e tardio, LTRs de retrovírus e da metalotioneína I de camundongo.

[0089] Os promotores adequados para a expressão ou para a superexpressão de um polipeptídeo em bactérias incluem os promotores lac ou trp de E. coli, o promotor lacI, o promotor lacZ, o promotor T3, o promotor T7, o promotor gpt, o promotor lambda PR, o promotor lambda PL, os promotores de operons que codificam enzimas glicolíticas tal como 3-fosfoglicerato quinase (PGK) e o promotor da fosfatase ácida. Os promotores eucarióticos incluem o promotor inicial imediato do CMV, o

promotor da timidina quinase do HSV, os promotores de choque térmico, o promotor de SV40 inicial e tardio, LTRs de retrovírus e o promotor da metalotioneína I de camundongo. Outros promotores conhecidos por controlarem a expressão de genes em células procarióticas ou eucarióticas ou seus vírus também podem ser utilizados.

Vetores de expressão e veículos de clonagem

[0090] A invenção fornece sistemas de expressão, por exemplo, cassetes de expressão, vetores, veículos de clonagem e similares, que compreendem os ácidos nucleicos da invenção, por exemplo, as sequências que codificam as fitas da invenção, para a expressão e a superexpressão, dos polipeptídeos da invenção (e ácidos nucleicos, por exemplo, antissenso). Os vetores de expressão e os veículos de clonagem da invenção podem compreender partículas virais, baculovírus, fago, plasmídeos, fagemídeos, cosmídeos, foscídeos, cromossomos artificiais de bactéria, DNA viral (por exemplo, vaccinia, adenovírus, fowl pox vírus, pseudorraiva e derivados de SV40), cromossomos artificiais baseados em P1, plasmídeos de levedura, cromossomos artificiais de levedura e quaisquer outros vetores específicos para hospedeiros específicos de interesse (tais como bacilos, *Aspergillus* e levedura). Os vetores da invenção podem incluir sequências de DNA cromossômicas, não-cromossômicas e sintéticas. Grandes números de vetores adequados são conhecidos pelos versados na técnica e estão disponíveis comercialmente. Os exemplos de vetores incluem: bacterianos: vetores pQE (Qiagen), plasmídeos pBluescript, vetores pNH, (vetores lambda-ZAP (Stratagene); ptrc99a, pKK223-3, pDR540, pRIT2T (Pharmacia); Eucarióticos: pXT1, pSG5 (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG, pSVLSV40 (Pharmacia). Entretanto, qualquer outro plasmídeo ou outro vetor pode ser utilizado contanto que possa ser replicado e viável no

hospedeiro. Vetores com baixo número de cópias ou com alto número de cópias podem ser empregados com a presente invenção.

[0091] Como exemplos representativos de vetores de expressão que podem ser utilizados podem ser mencionados partículas virais, baculovírus, fago, plasmídeos, fagemídeos, cosmídeos, fosmídeos, cromossomos artificiais de bactéria, DNA viral (por exemplo, vaccinia, adenovírus, fowl pox vírus, pseudorraiva e derivados de SV40), cromossomos artificiais baseados em P1, plasmídeos de levedura, cromossomos artificiais de levedura e quaisquer outros vetores específicos para hospedeiros específicos de interesse (tais como bacilos, *Aspergillus* e levedura). Assim, por exemplo, o DNA pode ser incluído em qualquer um de uma variedade de vetores de expressão para a expressão de um polipeptídeo. Tais vetores incluem sequências de DNA cromossômicas, não-cromossômicas e sintéticas. Grandes números de vetores adequados são conhecidos pelos versados na técnica e estão disponíveis comercialmente. Os vetores a seguir são fornecidos com a finalidade de exemplo; Bacterianos: vetores pQE (Qiagen), plasmídeos pBluescript, vetores pNH, (vetores lambda-ZAP (Stratagene); ptrc99a, pKK223-3, pDR540, pRIT2T (Pharmacia); Eucarióticos: pXT1, pSG5 (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG, pSVLSV40 (Pharmacia). Entretanto, qualquer outro plasmídeo ou outro vetor pode ser utilizado contanto que possa ser replicado e viável no hospedeiro. Vetores com baixo número de cópias ou com alto número de cópias podem ser empregados com a presente invenção.

[0092] Um exemplo de vetor para uso na presente invenção contém replicação com origem no fator f. O fator f (ou fator de fertilidade) em *E. coli* é um plasmídeo que realiza a transferência em alta frequência dele mesmo durante a conjugação e a transferência menos frequente do próprio

cromossomo bacteriano. Um aspecto utiliza vetores de clonagem, referidos como "fossímídeos" ou vetores de cromossomo artificial de bactéria (BAC). Estes são derivados do fator f de E. coli que é capaz de integrar de forma estável grandes segmentos de DNA genômico. Quando integrados com o DNA de uma amostra ambiental não cultivada mista, tornam possível conseguir grandes fragmentos genômicos na forma de uma "biblioteca de DNA ambiental" estável.

[0093] Um outro tipo de vetor para uso na presente invenção é um vetor de cosmídeo. Os vetores de cosmídeo foram originalmente planejados para clonar e propagar grandes segmentos de DNA genômico. A clonagem nos vetores de cosmídeo é descrita em detalhes em "Molecular Cloning: A laboratory Manual" (Sambrook e outros, 1989).

[0094] A sequência de DNA no vetor de expressão é ligada de forma operacional a uma ou mais sequências de controle da expressão (promotor(es)) apropriadas para direcionar a síntese de RNA. Os promotores bacterianos citados particulares incluem lacI, lacZ, T3, T7, gpt, lambda PR, PL e trp. Os promotores eucarióticos incluem o inicial imediato do CMV, o da timidina quinase do HSV, o do SV40 inicial e tardio, LTRs de retrovírus e da metalotioneína I de camundongo. A seleção do vetor e do promotor apropriados está bem dentro do nível da perícia comum na técnica. O vetor de expressão contém ainda um sítio de ligação ao ribossomo para o início da tradução e um terminador da transcrição. O vetor também pode incluir sequências apropriadas para a amplificação da expressão. As regiões promotoras podem ser selecionadas de qualquer gene desejado utilizando vetores CAT (cloranfenicol transferase) ou outros vetores com marcadores que podem ser selecionados. Em adição, os vetores de expressão podem conter um ou mais genes marcadores que podem ser selecionados para

fornecer uma característica fenotípica para a seleção de células hospedeiras transformadas tal como di-hidrofolato redutase ou resistência à neomicina para a cultura de células eucarióticas ou resistência à tetraciclina ou à ampicilina em *E. coli*.

[0095] Em um aspecto, os cassetes de expressão da invenção compreendem uma sequência da invenção e uma sequência de nucleotídeo que é capaz de afetar a expressão de um gene estrutural (isto é, uma sequência que codifica proteína, tal como uma fitase da invenção) em um hospedeiro compatível com tais sequências. Os cassetes de expressão incluem pelo menos um promotor ligado de forma operacional com a sequência que codifica polipeptídeo; e, opcionalmente, com outras sequências, por exemplo, sinais de término da transcrição. Também podem ser utilizados fatores adicionais necessários ou úteis na realização da expressão, por exemplo, intensificadores. Em um aspecto, "ligado de forma operacional", como utilizado aqui, refere-se à ligação de um promotor a montante de uma sequência de DNA de forma que o promotor medie a transcrição da sequência de DNA. Assim, os cassetes de expressão incluem ainda plasmídeos, vetores de expressão, vírus recombinantes, qualquer forma de vetor de "DNA nu" recombinante e similares. Em um aspecto, um "vetor" compreende um ácido nucleico que pode infectar, transfectar, transduzir de forma transitória ou permanente uma célula. Um vetor pode ser um ácido nucleico nu ou um ácido nucleico complexado com proteína ou lipídeo. O vetor compreende opcionalmente ácidos nucleicos e/ou proteínas e/ou membranas virais ou bacterianas (por exemplo, uma membrana celular, um envelope lipídico viral etc.). Em um aspecto, os vetores incluem, mas não-estão limitados a replicons (por exemplo, replicons de RNA, bacteriófagos) aos quais os fragmentos de DNA podem ser ligados e ser

replicados. Em um aspecto, os vetores incluem, mas não-estão limitados a RNA, DNA ou RNA circular autorreplicante autônomo ou linear (por exemplo, plasmídeos, víruses e similares, ver, por exemplo, a Patente U.S. No 5.217.879) e incluem tanto plasmídeos de expressão como sem-expressão. Quando um micro-organismo ou uma cultura de células recombinantes é descrita como hospedando um "vetor de expressão" este inclui tanto DNA circular e linear extracromossômico quanto DNA que foi incorporado no(s) cromossomo(s) do hospedeiro. Quando um vetor está sendo mantido por uma célula hospedeira, o vetor pode ser replicado de forma estável pelas células durante a mitose como uma estrutura autônoma ou pode estar incorporado dentro do genoma do hospedeiro.

[0096] O vetor de expressão pode compreender um promotor, um sítio de ligação ao ribossomo para o início da tradução e um terminador da transcrição. O vetor pode também incluir sequências apropriadas para amplificar a expressão. Os vetores de expressão de mamífero podem compreender uma origem de replicação, quaisquer sítios de ligação ao ribossomo necessários, um sítio de poliadenilação, sítios doadores e receptores para processamento, sequências de término da transcrição e sequências não-transcritas flanqueadoras a 5'. Em alguns aspectos, as sequências de DNA derivadas dos sítios de combinação e de poliadenilação do SV40 podem ser utilizadas para fornecer os elementos genéticos não-transcritos necessários.

[0097] Em um aspecto, os vetores de expressão contêm um ou mais genes marcadores que podem ser selecionados para permitir a seleção de células hospedeiras que contêm o vetor. Tais marcadores que podem ser selecionados incluem genes que codificam di-hidrofolato redutase ou genes que conferem resistência à neomicina para cultura de células eucarióticas,

genes que conferem resistência à tetraciclina ou à ampicilina em *E. coli* e o gene TRP1 de *S. cerevisiae*. As regiões promotoras podem ser selecionadas de qualquer gene desejado utilizando vetores com cloranfenicol transferase (CAT) ou outros vetores com marcadores que podem ser selecionados.

[0098] Os vetores para a expressão do polipeptídeo ou de um fragmento do mesmo em células eucarióticas também podem conter intensificadores para aumentar os níveis de expressão. Os intensificadores são elementos de DNA que atuam em cis, geralmente de aproximadamente 10 até aproximadamente 300 pb de comprimento que atuam sobre um promotor para aumentar a sua transcrição. Os exemplos incluem o intensificador de SV40 do lado tardio dos 100 até 270 pb da origem de replicação, o intensificador do promotor inicial de citomegalovírus, o intensificador de políoma do lado tardio da origem de replicação e os intensificadores de adenovírus.

[0099] Uma sequência de DNA pode ser inserida em um vetor através de uma variedade de procedimentos. Em geral, a sequência de DNA é ligada na posição desejada no vetor após a digestão do inserto e do vetor com endonucleases de restrição apropriadas. Alternativamente, pontas cegas tanto no inserto quanto no vetor podem ser ligadas. Uma variedade de técnicas de clonagem é conhecida na técnica, por exemplo, como descrito em Ausubel e Sambrook. Tais procedimentos e outros são considerados como estando dentro do escopo da perícia da técnica.

[00100] O vetor pode estar na forma de um plasmídeo, uma partícula viral ou um fago. Outros vetores incluem sequências de DNA cromossômicas, não-cromossômicas e sintéticas, derivados de SV40; plasmídeos bacterianos, DNA de fago, baculovírus, plasmídeos de levedura, vetores derivados de combinações de plasmídeos e DNA de fago, DNA viral

tal como vaccinia, adenovírus, fowl pox vírus e pseudorraiva. Uma variedade de vetores de clonagem e de expressão para uso com hospedeiros procarióticos e eucarióticos é descrita, por exemplo, por Sambrook.

[00101] Os vetores bacterianos particulares que podem ser utilizados incluem os plasmídeos disponíveis comercialmente que compreendem elementos genéticos do vetor de clonagem pBR322 bem conhecido (ATCC 37017), pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suécia), GEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA) pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen), pD10, psiX174 pBluescript II KS, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A (Stratagene), ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia), pKK232-8 e pCM7. Os vetores eucarióticos particulares incluem pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG e pSVL (Pharmacia). Entretanto, qualquer outro vetor pode ser utilizado contanto que este possa ser replicado e viável na célula hospedeira.

Células hospedeiras e células transformadas

[00102] A invenção fornece ainda uma célula transformada que compreende uma sequência de ácido nucleico da invenção, por exemplo, uma sequência que codifica uma fitase da invenção ou que compreende um cassete de expressão, um vetor, um veículo de clonagem, um vetor de expressão, um vetor de clonagem da invenção. A célula hospedeira pode ser qualquer uma das células hospedeiras familiares aos versados na técnica, incluindo células procarióticas, células eucarióticas, tais como células de bactéria, células de fungo, células de levedura, células de mamífero, células de inseto ou células vegetais. Os exemplos de células bacterianas incluem quaisquer espécies dentro dos gêneros *Escherichia*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Salmonella*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus*, incluindo, por exemplo, *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*,

Salmonella typhimurium, *Pseudomonas fluorescens*. Os exemplos de células de fungo incluem quaisquer espécies de *Aspergillus*. Os exemplos de células de levedura incluem quaisquer espécies de *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* ou *Schwanniomyces*, incluindo *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* ou *Schizosaccharomyces pombe*. Os exemplos de células de inseto incluem quaisquer espécies de *Spodoptera* ou *Drosophila*, incluindo *Drosophila S2* e *Spodoptera Sf9*. Os exemplos de células de inseto incluem *Drosophila S2* e *Spodoptera Sf9*. Os exemplos de células de levedura incluem *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* ou *Schizosaccharomyces pombe*. Os exemplos de células de animais incluem CHO, COS ou melanoma de Bowes ou qualquer linhagem de células de camundongo ou humana. A seleção de um hospedeiro apropriado está dentro das capacidades dos versados na técnica.

[00103] O vetor pode ser introduzido nas células hospedeiras utilizando qualquer uma de uma variedade de técnicas, incluindo transformação, transfecção, transdução, infecção viral, pistolas gênicas ou transferência gênica mediada por Ti. Os métodos particulares incluem transfecção com fosfato de cálcio, transfecção mediada por DEAE-Dextrano, lipofecção ou eletroporação (Davis, L., Dibner, M., Battey, I., *Basic Methods in Molecular Biology*, (1986)).

[00104] Quando apropriado, as células hospedeiras engenheiradas podem ser cultivadas em meios com nutrientes convencionais modificados quando apropriado para a ativação de promotores, para a seleção de transformantes ou para a amplificação dos genes da invenção. Após a transformação de uma cepa hospedeira adequada e o cultivo da cepa hospedeira até uma densidade celular apropriada, o promotor selecionado pode ser induzido através de meios apropriados (por exemplo, alteração da

temperatura ou indução química) e as células podem ser cultivadas durante um período adicional para permitir que estas produzam o polipeptídeo desejado ou um fragmento do mesmo.

[00105] As células podem ser coletadas por centrifugação, rompidas através de meios físicos ou químicos e o extrato bruto resultante é mantido para purificação adicional. As células microbianas empregadas para a expressão de proteínas podem ser rompidas através de qualquer método conveniente, incluindo ciclos de congelamento-descongelamento, ultrassom, rompimento mecânico ou uso de agentes de lise celular. Tais métodos são bem conhecidos pelos versados na técnica. O polipeptídeo expresso ou o fragmento do mesmo pode ser recuperado e purificado partindo de culturas de células recombinantes através de métodos que incluem precipitação com sulfato de amônio ou etanol, extração ácida, cromatografia por troca aniônica ou catiônica, cromatografia em fosfocelulose, cromatografia por interação hidrofóbica, cromatografia em hidroxilapatita e cromatografia em lectina. As etapas de redobramento das proteínas podem ser utilizadas, quando necessário, para completar a configuração do polipeptídeo. Se desejado, a cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) pode ser empregada para as etapas finais de purificação.

[00106] Os constructos nas células hospedeiras podem ser utilizados de uma maneira convencional para produzir o produto gênico codificado pela sequência recombinante. Dependendo do hospedeiro empregado em um procedimento de produção recombinante, os polipeptídeos produzidos pelas células hospedeiras que contêm o vetor podem ser glicosilados ou podem ser não-glicosilados. Os polipeptídeos da invenção podem ou não incluir ainda um resíduo de aminoácido metionina inicial.

[00107] Sistemas de tradução isentos de células também podem ser

empregados para a produção de um polipeptídeo da invenção. Os sistemas de tradução isentos de células podem utilizar mRNAs transcritos partindo de um constructo de DNA que compreende um promotor ligado de forma operacional a um ácido nucleico que codifica o polipeptídeo ou um fragmento do mesmo. Em alguns aspectos, o constructo de DNA pode ser linearizado antes de realizar uma reação de transcrição *in vitro*. O mRNA transcrito é então incubado com um extrato de tradução isento de células apropriado, tal como um extrato de reticulócitos de coelho, para a produção do polipeptídeo desejado ou de um fragmento do mesmo.

[00108] Os vetores de expressão podem conter um ou mais genes marcadores que podem ser selecionados para fornecer uma característica fenotípica para a seleção de células hospedeiras transformadas tal como dihidrofolato redutase ou resistência à neomicina para cultura de células eucarióticas ou tal como resistência à tetraciclina ou à ampicilina em *E. coli*.

[00109] Os ácidos nucleicos da invenção podem ser expressos ou superexpressos, em qualquer sistema de expressão *in vitro* ou *in vivo*. Quaisquer sistemas de cultura de células podem ser empregados para expressar ou superexpressar, proteína recombinante, incluindo culturas bacterianas, de inseto, de levedura, de fungo ou de mamífero. A superexpressão pode ser realizada através da escolha apropriada de promotores, intensificadores, vetores (por exemplo, uso de vetores de replicon, vetores dicistrônicos (ver, por exemplo, Gurtu (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229:295-8)), meios, sistemas de cultura e similares. Em um aspecto, a amplificação gênica utilizando marcadores de seleção, por exemplo, glutamina sintetase (ver, por exemplo, Sanders (1987) *Dev. Biol. Stand.* 66:55-63), em sistemas de células é utilizada para superexpressar os polipeptídeos da invenção.

[00110] Vários sistemas de cultura de células de mamífero podem ser empregados para expressar uma proteína recombinante e os exemplos de sistemas de expressão de mamífero incluem as linhagens COS-7 de fibroblastos renais de macaco, descritas em "SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants" (Gluzman, 1981) e outras linhagens de células capazes de expressar um vetor compatível, por exemplo, as linhagens de células C127, 3T3, CHO, HeLa e BHK. Os vetores de expressão de mamífero compreenderão uma origem de replicação, um promotor e um intensificador adequados e também quaisquer sítios de ligação ao ribossomo necessários, sítio de poliadenilação, sítios doadores e receptores para processamento, sequências de término da transcrição e sequências não-transcritas flanqueadoras a 5'. As sequências de DNA derivadas dos sítios de combinação e de poliadenilação de SV40 podem ser utilizadas para fornecer os elementos genéticos não-transcritos necessários.

[00111] As células hospedeiras que contêm os polinucleotídeos de interesse podem ser cultivadas em meios de nutrientes convencionais modificados quando apropriado para a ativação de promotores, para a seleção de transformantes ou para a amplificação de genes. As condições de cultura, tais como temperatura, pH e similares, são aquelas utilizadas anteriormente com a célula hospedeira selecionada para expressão e serão evidentes para o versado comum na técnica. Os clones que são identificados como possuindo a atividade enzimática especificada podem então ser sequenciados para a identificação da sequência de polinucleotídeos que codifica uma enzima que possui a atividade aumentada.

Amplificação de Ácidos Nucleicos

[00112] Na prática da invenção, os ácidos nucleicos que codificam os

polipeptídeos da invenção ou ácidos nucleicos modificados, podem ser produzidos, por exemplo, através de amplificação. A invenção fornece pares de sequências de iniciadores de amplificação para a amplificação de ácidos nucleicos que codificam polipeptídeos com uma atividade de fitase ou subsequências dos mesmos, em que os pares de iniciadores são capazes de amplificar sequências de ácidos nucleicos que incluem o exemplo da SEQ ID NO: 1 e pelo menos uma das modificações de sequência específica apresentadas anteriormente. Um versado na técnica pode planejar pares de sequências de iniciadores de amplificação para qualquer parte de ou para o comprimento completo destas sequências; por exemplo:

A SEQ ID NO: 1 "original" é

ATGAAAGCGATCTTAATCCCATTTTTATCTCTTCTGA
 TTCCGTTAACCCCGCAATCTGCATTCGCTCAGAGTGAGCCGGAGC
 TGAAGCTGGAAAGTGTGGTGATTGTCAGTCGTCATGGTGTGCGTG
 CTCCAACCAAGGCCACGCAACTGATGCAGGATGTCACCCCAGAC
 GCATGGCCAACCTGGCCGGTAAACTGGGTGAGCTGACACCGCG
 CGGTGGTGAGCTAATCGCCTATCTCGGACATTACTGGCGTCAGCG
 TCTGGTAGCCGACGGATTGCTGCCTAAATGTGGCTGCCCCGAGTC
 TGGTCAGGTCGCGATTATTGCTGATGTCGACGAGCGTACCCGTAA
 AACAGGCGAAGCCTTCGCCGCCGGGCTGGCACCTGACTGTGCAA
 TAACCGTACATACCCAGGCAGATACGTCCAGTCCCGATCCGTTAT
 TTAATCCTCTAAAACTGGCGTTTGCCAACTGGATAACGCGAACG
 TGA CTGACGCGATCCTCGAGAGGGCAGGAGGGTCAATTGCTGAC
 TTTACCGGGCATTATCAAACGGCGTTTCGCGAACTGGAACGGGTG
 CTTAATTTTCCGCAATCAAACCTTGTGCCTTAAACGTGAGAAACAG
 GACGAAAGCTGTTTATTAAACGCAGGCATTACCATCGGAACTCAA
 GGTGAGCGCCGACTGTGTCTCATTAACCGGTGCGGTAAGCCTCGC

ATCAATGCTGACGGAGATATTTCTCCTGCAACAAGCACAGGGAAT
 GCCGGAGCCGGGGTGGGGAAGGATCACCGATTACACACCAGTGGA
 ACACCTTGCTAAGTTTGCATAACGCGCAATTTGATTTGCTACAAC
 GCACGCCAGAGGTTGCCCCGAGCCGCGCCACCCCGTTATTAGATT
 TGATCAAGACAGCGTTGACGCCCCATCCACCGCAAAAACAGGCG
 TATGGTGTGACATTACCCACTTCAGTGCTGTTTATCGCCGGACAC
 GATACTAATCTGGCAAATCTCGGCGGCGCACTGGAGCTCAACTGG
 ACGCTTCCCGGTCAGCCGGATAACACGCCGCCAGGTGGTGAAC
 GGTGTTTGAACGCTGGCGTCGGCTAAGCGATAACAGCCAGTGGA
 TTCAGGTTTCGCTGGTCTTCCAGACTTTACAGCAGATGCGTGATA
 AAACGCCGCTGTCATTAAATACGCCGCCCGGAGAGGTGAACTG
 ACCCTGGCAGGATGTGAAGAGCGAAATGCGCAGGGGCATGTGTTC
 GTTGGCAGGTTTTACGCAAATCGTGAATGAAGCACGCATACCGGC
 GTGCAGTTTGAGATCTCATCTA

Assim, um par de sequências de iniciadores de amplificação para a amplificação desta sequência original ou de um dos exemplos de sequências da invenção que possui pelo menos uma das modificações de sequência específicas apresentadas aqui, pode ser os resíduos 1 até 21 da SEQ ID NO: 1 (isto é, ATGAAAGCGATCTTAATCCCA) e o fita complementar dos últimos 21 resíduos da SEQ ID NO: 1 (isto é, o fita complementar de TGCAGTTTGAGATCTCATCTA).

[00113] As reações de amplificação também podem ser utilizadas para quantificar a quantidade de ácido nucleico em uma amostra (tal como a quantidade de mensagem em uma amostra de célula), para marcar o ácido nucleico (por exemplo, para aplicá-lo em um arranjo ou um blot), para detectar o ácido nucleico ou para quantificar a quantidade de um ácido nucleico específico em uma amostra. Em um aspecto da invenção, a

mensagem isolada de uma célula ou de uma biblioteca de cDNA é amplificada. O versado na técnica pode selecionar e planejar iniciadores de amplificação de oligonucleotídeos. Os métodos de amplificação são bem conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, a reação em cadeia da polimerase, PCR (ver, por exemplo, PCR PROTOCOLS, A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS, ed. Innis, Academic Press, N.Y. (1990) e PCR STRATEGIES (1995), ed. Innis, Academic Press, Inc., N.Y.); reação em cadeia da ligase (LCR) (ver, por exemplo, Wu (1989) Genomics 4:560; Landegren (1988) Science 241:1077; Barringer (1990) Gene 89:117); amplificação por transcrição (ver, por exemplo, Kwoh (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173); e, replicação de sequências autossustentada (ver, por exemplo, Guatelli (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874); amplificação através da replicase Q Beta (ver, por exemplo, Smith (1997) J. Clin. Microbiol. 35:1477-1491), ensaio de amplificação automatizada através da replicase Q-beta (ver, por exemplo, Burg (1996) Mol. Cell. Probes 10:257-271) e outras técnicas mediadas pela RNA polimerase (por exemplo, NASBA, Cangene, Mississauga, Ontário); ver, também Berger (1987) Methods Enzymol. 152:307-316; Sambrook; Ausubel; Patentes U.S. Nos 4.683.195 e 4.683.202; Sooknanan (1995) Biotechnology 13:563-564.

Determinação do grau de identidade de sequência

[00114] A invenção fornece um ácido nucleico isolado, sintético ou recombinante que compreende uma sequência de ácido nucleico que possui pelo menos 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 1 e que inclui pelo menos uma das modificações enumeradas especificamente na SEQ ID NO: 1 discutidas anteriormente. Em um aspecto,

a extensão da identidade de sequência (homologia) pode ser determinada utilizando qualquer programa de computador e parâmetros associados, incluindo os descritos aqui, tal como BLAST 2.2.2 ou FASTA versão 3.0t78, com os parâmetros predeterminados.

[00115] As sequências homólogas incluem ainda sequências de RNA em que as uridinas substituem as timinas nas sequências de ácidos nucleicos. As sequências homólogas podem ser obtidas utilizando qualquer um dos procedimentos descritos aqui ou podem resultar da correção de um erro de sequenciamento.

[00116] Vários programas de comparação de sequências identificados aqui são utilizados neste aspecto da invenção. As identidades de sequência de proteínas e/ou de ácidos nucleicos (homologias) podem ser avaliadas utilizando qualquer um da variedade de algoritmos e programas de comparação de sequências conhecidos na técnica. Tais algoritmos e programas incluem, mas não-estão limitados a TBLASTN, BLASTP, FASTA, TFASTA e CLUSTALW (Pearson e Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85(8):2444-2448, 1988; Altschul e outros, J. Mol. Biol. 215(3):403-410, 1990; Thompson e outros, Nucleic Acids Res. 22(2):4673-4680, 1994; Higgins e outros, Methods Enzymol. 266:383-402, 1996; Altschul e outros, J. Mol. Biol. 215(3):403-410, 1990; Altschul e outros, Nature Genetics 3:266-272, 1993).

[00117] A homologia ou a identidade pode ser medida utilizando um software de análise de sequências (por exemplo, Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705). Tal software combina sequências similares através da atribuição de graus de homologia a várias deleções, substituições e outras modificações. Os termos

"homologia" e "identidade" no contexto de duas ou mais sequências de ácidos nucleicos ou de polipeptídeos, referem-se a duas ou mais sequências ou subsequências que são as mesmas ou que possuem uma porcentagem especificada de resíduos de aminoácidos ou de nucleotídeos que é a mesma quando comparadas e alinhadas para correspondência máxima ao longo de uma janela de comparação ou região indicada que é medida utilizando qualquer número de algoritmos de comparação de sequências ou através de alinhamento manual e inspeção visual. Para a comparação de sequências, uma sequência pode atuar como uma sequência de referência (um exemplo de sequência da invenção) com a qual as sequências de teste são comparadas. Quando é utilizado um algoritmo de comparação de sequências, sequências de teste e de referência são inseridas em um computador, coordenadas de subsequências são determinadas, se necessário e os parâmetros do programa do algoritmo de sequência são designados. Podem ser utilizados os parâmetros preestabelecidos do programa ou parâmetros alternativos podem ser designados. O algoritmo de comparação de sequências então calcula a porcentagem de identidades de sequência para as sequências de teste em relação à sequência de referência, com base nos parâmetros do programa.

[00118] Uma "janela de comparação", como utilizado aqui, inclui referência a um segmento de qualquer um do número de resíduos contíguos. Por exemplo, em aspectos alternativos da invenção, resíduos contíguos variando em qualquer lugar de 20 até o comprimento completo dos exemplos de sequências da invenção são comparados com uma sequência de referência do mesmo número de posições contíguas após as duas sequências serem alinhadas de forma ótima. Se a sequência de referência tiver a identidade de sequência necessária em relação aos exemplos de sequências

da invenção, por exemplo, 98% de identidade de sequência com a SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 e possuir uma das modificações de sequência específica citadas anteriormente, tal sequência está dentro do âmbito da invenção. Em modalidades alternativas, subsequências variando de aproximadamente 20 até 600, aproximadamente 50 até 200 e aproximadamente 100 até 150 são comparadas com uma sequência de referência do mesmo número de posições contíguas após as duas sequências serem alinhadas de forma ótima. Os métodos de alinhamento da sequência para comparação são bem conhecidos na técnica. O alinhamento ótimo das sequências para comparação pode ser realizado, por exemplo, pelo algoritmo de homologia local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482, 1981, pelo algoritmo de alinhamento por homologia de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970, pelo método de busca por similaridade de Person & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988, por implementações computadorizadas destes algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA e TFASTA no Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) ou por alinhamento manual e inspeção visual. Outros algoritmos para a determinação de homologia ou identidade incluem, por exemplo, em adição ao programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool at the National Center for Biological Information), ALIGN, AMAS (Analysis of Multiply Aligned Sequences), AMPS (Protein Multiple Sequence Alignment), ASSET (Aligned Segment Statistical Evaluation Tool), BANDS, BESTSCOR, BIOSCAN (Biological Sequence Comparative Analysis Node), BLIMPS (BBlocks IMProved Searcher), FASTA, Intervals & Points, BMB, CLUSTAL V, CLUSTAL W, CONSENSUS, LCONSENSUS, WCONSENSUS, algoritmo de Smith-Waterman, DARWIN, algoritmo de Las Vegas, FNAT (Forced Nucleotide Alignment

Tool), Framealign, Framesearch, DYNAMIC, FILTER, FSAP (Fristensky Sequence Analysis Package), GAP (Global Alignment Program), GENAL, GIBBS, GenQuest, ISSC (Sensitive Sequence Comparison), LALIGN (Local Sequence Alignment), LCP (Local Content Program), MACAW (Multiple Alignment Construction & Analysis Workbench), MAP (Multiple Alignment Program), MBLKP, MBLKN, PIMA (Pattern-Induced Multi-sequence Alignment), SAGA (Sequence Alignment by Genetic Algorithm) e WHAT-IF. Tais programas de alinhamento também podem ser utilizados para verificar bancos de dados genômicos para identificar sequências de polinucleotídeos que possuem sequências substancialmente idênticas. Está disponível um número de bancos de dados genômicos, por exemplo, uma parte substancial do genoma humano está disponível como parte do Human Genome Sequencing Project (Gibbs, 1995). Vários genomas foram sequenciados, por exemplo, *M. genitalium* (Fraser e outros, 1995), *M. jannaschii* (Bult e outros, 1996), *H. influenzae* (Fleischmann e outros, 1995), *E. coli* (Blattner e outros, 1997) e levedura (*S. cerevisiae*) (Mewes e outros, 1997) e *D. melanogaster* (Adams e outros, 2000). Também foi feito progresso significativo no sequenciamento dos genomas de organismos modelos, tais como camundongo, *C. elegans* e *Arabidopsis* sp. Os bancos de dados que contêm informação genômica comentada com alguma informação funcional são mantidos por organizações diferentes e são acessíveis pela internet.

[00119] Os algoritmos BLAST, BLAST 2.0 e BLAST 2.2.2 também são utilizados na prática da invenção. São descritos, por exemplo, em Altschul (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402; Altschul (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410. O software para a realização das análises de BLAST está disponível ao público através do National Center for Biotechnology

Information. Este algoritmo envolve uma primeira identificação de pares de sequências de alto valor de escore (HSPs) através da identificação de palavras curtas de comprimento W na sequência de busca, que se combinam ou satisfazem parte do escore T limiar de valor positivo quando alinhadas com uma palavra do mesmo comprimento em uma sequência do banco de dados. T é referido como o limiar do escore da palavra da vizinhança (Altschul (1990) supra). Estas coincidências de palavras da vizinhança iniciais atuam como origens para o início de buscas para encontrar HSPs mais longos contendo as mesmas. As coincidências de palavras são estendidas em ambas as direções ao longo de cada sequência até o ponto que o escore de alinhamento cumulativo possa ser aumentado. Os escores cumulativos são calculados utilizando, para sequências de nucleotídeos, os parâmetros M (escore de recompensa para um par de resíduos que se combinam; sempre >0). Para sequências de aminoácidos, uma matriz de obtenção de escore é utilizada para calcular o escore cumulativo. A extensão das coincidências das palavras em cada direção é interrompida quando: o escore de alinhamento cumulativo diminui até a quantidade X partindo de seu valor máximo atingido; o escore cumulativo vai até zero ou abaixo disso, devido ao acúmulo de um ou mais alinhamentos de resíduos com escore negativo; ou o final de qualquer uma das sequências é atingido. Os parâmetros W , T e X do algoritmo BLAST determinam a sensibilidade e a velocidade do alinhamento. O programa BLASTN (para sequências de nucleotídeos) utiliza como valores preestabelecidos um comprimento de palavra (W) de 11, uma expectativa (E) de 10, $M=5$, $N=-4$ e uma comparação de ambos os fitas. Para as sequências de aminoácidos, o programa BLASTP utiliza como valores preestabelecidos um comprimento de palavra de 3 e expectativas (E) de 10 e a matriz de obtenção de escore

BLOSUM62 (ver, Henikoff & Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915) alinhamentos (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N= -4 e uma comparação de ambos os fitas. O algoritmo BLAST também realiza uma análise estatística da similaridade entre duas sequências (ver, por exemplo, Karlin & Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873). Uma medida da similaridade fornecida pelo algoritmo BLAST é a probabilidade da menor soma ($P(N)$), que fornece uma indicação da probabilidade em que uma combinação entre duas sequências de nucleotídeos ou de aminoácidos ocorreria ao acaso. Por exemplo, um ácido nucleico é considerado similar a uma sequência de referência se a probabilidade da menor soma em uma comparação do ácido nucleico de teste com o ácido nucleico de referência for menor que aproximadamente 0,2, menor que aproximadamente 0,01 ou menor que aproximadamente 0,001. Em um aspecto, as homologias de sequências de proteínas e de ácidos nucleicos são avaliadas utilizando a Basic Local Alignment Search Tool ("BLAST"). Por exemplo, cinco programas BLAST específicos podem ser utilizados para realizar a tarefa a seguir: (1) BLASTP e BLAST3 comparam uma sequência de aminoácidos de busca contra um banco de dados de sequências de proteínas; (2) BLASTN compara uma sequência de nucleotídeos de busca contra um banco de dados de sequências de nucleotídeos; (3) BLASTX compara os produtos da tradução conceitual de seis quadros de uma sequência de nucleotídeos de busca (ambas as fitas) contra um banco de dados de sequências de proteínas; (4) TBLASTN compara uma sequência de proteína de busca contra um banco de dados de sequências de nucleotídeos traduzido em todos os seis quadros de leitura (ambas as fitas); e, (5) TBLASTX compara as traduções de seis quadros de uma sequência de nucleotídeos de busca contra as traduções de seis quadros de um banco de dados de

sequências de nucleotídeos. Os programas BLAST identificam sequências homólogas através da identificação de segmentos similares, que são referidos aqui como "pares de segmentos de alto valor de escore", entre uma sequência de aminoácidos ou de ácido nucleico de busca e uma sequência de teste que pode ser obtida partindo de um banco de dados de sequências de proteínas ou de ácidos nucleicos. Os pares de segmentos de alto valor de escore podem ser identificados (isto é, alinhados) através de uma matriz de obtenção de escore, das quais muitas são conhecidas na técnica. Um exemplo de matriz de obtenção de escore utilizada é a matriz BLOSUM62 (Gonnet e outros, Science 256:1443-1445, 1992; Henikoff e Henikoff, Proteins 17:49-61, 1993). Alternativamente, as matrizes PAM ou PAM250 podem ser utilizadas (ver, por exemplo, Schwartz e Dayhoff, eds., 1978, Matrices for Detecting Distance Relationships: Atlas of Proteins Sequence and Structure, Washington: National Biomedical Research Foundation).

[00120] Em um aspecto da invenção, para determinar se um ácido nucleico possui a identidade de sequência necessária para estar dentro do âmbito da invenção, são utilizados os programas BLAST 2.2.2 do NCBI. Opções preestabelecidas para blastp. Há aproximadamente 38 opções de ajuste no programa BLAST 2.2.2. Neste exemplo de aspecto da invenção, todos os valores preestabelecidos são utilizados exceto para o ajuste de filtro preestabelecido (isto é, todos os parâmetros ajustados para os valores preestabelecidos exceto o filtro que é ajustado em OFF); no seu lugar é utilizado um ajuste "-F F", que desativa o filtro. O uso do filtro com valores preestabelecidos resulta frequentemente em violações de Karlin-Altschul devido ao comprimento curto da sequência.

[00121] Os valores preestabelecidos utilizados neste exemplo de aspecto da invenção incluem:

"Filtro para complexidade baixa: ON

- Tamanho de Palavra: 3
- Matriz: Blosun62
- Custos de espaço: Existência:11
- Extensão:1"

"Filtro para complexidade baixa: ON

Outros ajustes preestabelecidos são: filtro para complexidade baixa OFF, tamanho de palavra de 3 para proteína, matriz BLOSUM62, penalidade para existência de espaço de -11 e uma penalidade para extensão de espaço de -1.

Sistemas de computador e produtos de programas de computador

[00122] Para determinar e identificar identidades de sequência, homologias estruturais, motivos e similares in silico a sequência da invenção pode ser armazenada, gravada e manipulada em qualquer meio que pode ser lido e acessado por um computador. Os motivos que podem ser detectados utilizando os programas anteriores incluem sequências que codificam zíperes de leucina, motivos de hélice-volta-hélice, sítios de glicosilação, sítios de ubiquitinação, alfa hélices e folhas beta, sequências sinais que codificam peptídeos sinais que direcionam a secreção das proteínas codificadas, sequências implicadas na regulação da transcrição tais como homeoboxes, fitas ácidos, sítios ativos enzimáticos, sítios de ligação ao substrato e sítios de clivagem enzimática.

[00123] Consequentemente, a invenção fornece computadores, sistemas de computador, meios que pode ser lido pelo computador, produtos de programas de computador e similares gravadas ou armazenadas no mesmo as sequências de ácidos nucleicos e de polipeptídeos da invenção, por exemplo, os exemplos de sequências da invenção. Como utilizado aqui,

as palavras "gravado(a)" e "armazenado(a)" referem-se a um processo para armazenar informação em um meio de computador. Um versado na técnica pode facilmente adaptar quaisquer métodos conhecidos para gravar informação em um meio que pode ser lido pelo computador para gerar produtos que compreendem uma ou mais das sequências de ácidos nucleicos e/ou de polipeptídeos da invenção. Como utilizado aqui, os termos "computador", "programa de computador" e "processador" são utilizados em seus contextos gerais mais amplos e incorporam todos tais dispositivos, que são descritos aqui.

[00124] Um outro aspecto da invenção é um meio que pode ser lido pelo computador que possui gravado no mesmo pelo menos uma sequência de ácido nucleico e/ou de polipeptídeo da invenção. Os meios que podem ser lidos pelo computador incluem meios que podem ser lidos de forma magnética, meios que podem ser lidos de forma óptica, meios que podem ser lidos de forma eletrônica e meios magnéticos/ópticos. Por exemplo, os meios que podem ser lidos pelo computador podem ser um disco rígido, um disquete, uma fita magnética, um CD-ROM, um Disco Versátil Digital (DVD), uma Memória de Acesso Aleatório (RAM) ou uma Memória Apenas para Leitura (ROM) assim como outros tipos de outros meios conhecidos pelos versados na técnica.

[00125] Os aspectos da invenção incluem sistemas (por exemplo, sistemas baseados na internet), particularmente sistemas de computador, que armazenam e manipulam as sequências e a informação de sequências descritas aqui. Um exemplo de um sistema de computador 100 é ilustrado na forma de um diagrama de blocos na Figura 1. Como utilizado aqui, "um sistema de computador" refere-se aos componentes de hardware, aos componentes de software e aos componentes de armazenamento de dados

utilizados para analisar uma sequência de nucleotídeos ou de polipeptídeo da invenção. O sistema de computador 100 pode incluir um processador para processar, acessar e manipular os dados das sequências. O processador 105 pode ser qualquer tipo bem conhecido de unidade de processamento central, tal como, por exemplo, o Pentium III da Intel Corporation ou um processador similar da Sun, Motorola, Compaq, AMD ou International Business Machines. O sistema de computador 100 é um sistema de finalidades gerais que compreende o processador 105 e um ou mais componentes de armazenamento de dados internos 110 para armazenar dados e um ou mais dispositivos para a recuperação de dados armazenados nos componentes de armazenamento de dados. Um versado na técnica pode facilmente considerar que qualquer um dos sistemas de computador disponíveis atualmente é adequado.

[00126] Em um aspecto, o sistema de computador 100 inclui um processador 105 conectado a um barramento que é conectado a uma memória principal 115 (pode ser implementada como RAM) e um ou mais dispositivos de armazenamento de dados internos 110, tal como um disco rígido e/ou outros meios que podem ser lidos pelo computador que possuem dados gravados nos mesmos. O sistema de computador 100 pode incluir ainda um ou mais dispositivos de armazenamento de dados 118 para a leitura dos dados armazenados nos dispositivos de armazenamento de dados internos 110.

[00127] O dispositivo de recuperação de dados 118 pode representar, por exemplo, um drive para disquete, um drive para disco compacto, um drive para fita magnética ou um modem capaz de se conectar a um sistema de armazenamento de dados remoto (por exemplo, através da internet) etc. Em algumas modalidades, o dispositivo de armazenamento de dados interno

110 é um meio que pode ser lido pelo computador removível tal como um disquete, um disco compacto, uma fita magnética etc. contendo lógica de controle e/ou dados registrados no mesmo. O sistema de computador 100 pode vantajosamente incluir ou ser programado através de um software apropriado para a leitura da lógica de controle e/ou dos dados do componente de armazenamento de dados uma vez inseridos nos dispositivo de recuperação de dados.

[00128] O sistema de computador 100 inclui um monitor 120 que é utilizado para exibir o produto para um usuário do computador. Deve também ser citado que o sistema de computador 100 pode ser ligado a outros sistemas de computador 125a-c em uma rede ou uma rede de área ampla para fornecer acesso centralizado ao sistema de computador 100. O software para acessar e processar as sequências de nucleotídeos ou de aminoácidos da invenção pode ficar na memória principal 115 durante a execução.

[00129] Em alguns aspectos, o sistema de computador 100 pode compreender ainda um algoritmo de comparação de sequências para a comparação de uma sequência de ácido nucleico da invenção. O algoritmo e a(s) sequência(s) também podem ser armazenados em um meio que pode ser lido pelo computador. Um "algoritmo de comparação de sequências" refere-se a um ou mais programas que são implementados (de forma local ou remota) no sistema de computador 100 para comparar uma sequência de nucleotídeos com outras sequências de nucleotídeos e/ou compostos armazenados dentro de um meio de armazenamento de dados. Por exemplo, o algoritmo de comparação de sequências pode comparar as sequências de nucleotídeos da invenção com a sequência SEQ ID NO: 1 e/ou SEQ ID NO: 2 "original", armazenada em um meio que pode ser lido pelo computador com as sequências de referência armazenadas em um meio que pode ser lido

pelo computador para identificar homologias ou motivos estruturais.

[00130] Os parâmetros utilizados com os algoritmos anteriores podem ser adaptados dependendo do comprimento e do grau de homologia da sequência estudada. Em alguns aspectos, os parâmetros podem ser parâmetros preestabelecidos utilizados pelos algoritmos na ausência de instruções do usuário. A Figura 2 é um diagrama de fluxo que ilustra um aspecto de um processo 200 para a comparação de uma nova sequência de nucleotídeos ou de proteína com um banco de dados de sequências para determinar os níveis de homologia entre a nova sequência e as sequências no banco de dados. O banco de dados de sequências pode ser um banco de dados privado armazenado dentro do sistema de computador 100 ou um banco de dados público tal como o GENBANK que está disponível através da Internet. O processo 200 começa em uma posição de início 201 e então se move para uma posição 202 em que a nova sequência que será comparada é armazenada em uma memória em um sistema de computador 100. Como discutido anteriormente, a memória poderia ser qualquer tipo de memória, incluindo RAM ou um dispositivo de armazenamento interno.

[00131] O processo 200 então se move para uma posição 204 em que um banco de dados de sequências é aberto para a análise e a comparação. O processo 200 então se move para uma posição 206 em que a primeira sequência armazenada no banco de dados é lida em uma memória no computador. Uma comparação é então realizada em uma posição 210 para determinar se a primeira sequência é a mesma que a segunda sequência. É importante citar que esta etapa não-está limitada à realização de uma comparação exata entre a nova sequência e a primeira sequência no banco de dados. Métodos bem conhecidos são conhecidos pelos versados na técnica para a comparação de duas sequências de nucleotídeos ou de proteínas,

mesmo se estas não forem idênticas. Por exemplo, podem ser introduzidos espaços em uma sequência para aumentar o nível de homologia entre as duas sequências testadas. Os parâmetros que controlam o fato de espaços ou outras características serem introduzidas em uma sequência durante a comparação são normalmente inseridos pelo usuário do sistema de computador.

[00132] Uma vez que uma comparação das duas sequências foi realizada na posição 210, é feita uma determinação em uma posição de decisão 210 se as duas sequências são as mesmas. Evidentemente, o termo "as mesmas" não-está limitado às sequências que são absolutamente idênticas. Sequências que estão dentro dos parâmetros de homologia inseridos pelo usuário serão marcadas como "as mesmas" no processo 200. Se for feita uma determinação de que as duas sequências são as mesmas, o processo 200 se move para uma posição 214 em que o nome da sequência do banco de dados é exibido para o usuário. Esta posição notifica ao usuário que a sequência com o nome exibido satisfaz as restrições de homologia que foram inseridas. Uma vez que o nome da sequência armazenada é exibido para o usuário, o processo 200 se move para uma posição de decisão 218 em que é feita uma determinação se existem mais sequências no banco de dados. Se não existirem mais sequências no banco de dados, então o processo 200 termina na posição final 220. Entretanto, se existirem mais sequências no banco de dados, então o processo 200 se move para uma posição 224 em que um indicador é movido para a sequência seguinte no banco de dados de forma que esta pode ser comparada com a nova sequência. Desta maneira, a nova sequência é alinhada e comparada com cada sequência no banco de dados.

[00133] Deve ser citado que se tiver sido feita uma determinação na

posição de decisão 212 de que as sequências não eram homólogas, então o processo 200 se moveria imediatamente para a posição de decisão 218 para determinar se quaisquer outras sequências estariam disponíveis no banco de dados para comparação. Consequentemente, um aspecto da invenção é um sistema de computador que compreende um processador, um dispositivo de armazenamento de dados que possui armazenado no mesmo uma sequência de ácido nucleico da invenção e uma sequência comparadora para realizar a comparação. A sequência comparadora pode indicar um nível de homologia entre as sequências comparadas ou identificar motivos estruturais ou pode identificar motivos estruturais em sequências que são comparadas com estes códigos de ácidos nucleicos e códigos de polipeptídeos.

[00134] A Figura 3 é um diagrama de fluxo que ilustra uma modalidade de um processo 250 em um computador para determinar se duas sequências são homólogas. O processo 250 começa em uma posição de início 252 e então se move para uma posição 254 em que uma primeira sequência que será comparada é armazenada em uma memória. A segunda sequência que será comparada é então armazenada em uma memória em uma posição 256. O processo 250 então se move para uma posição 260 em que o primeiro caractere na primeira sequência é lido e então para uma posição 262 em que o primeiro caractere da segunda sequência é lido. Deve ser entendido que se a sequência for uma sequência de nucleotídeos, então o caractere seria normalmente A, T, C, G ou U. Se a sequência for uma sequência de proteína, então este pode ser um código de aminoácido de uma única letra de forma que a primeira e a segunda sequências podem ser facilmente comparadas. É feita então uma determinação em uma posição de decisão 264 se os dois caracteres são os mesmos. Se estes forem os mesmos, então o processo 250 se move para uma posição 268 em que os caracteres

seguintes na primeira e na segunda sequências são lidos. É feita então uma determinação se os caracteres seguintes são os mesmos. Se forem, então o processo 250 continua este procedimento repetidamente até que os dois caracteres não sejam os mesmos. Se for feita uma determinação de que os dois caracteres seguintes não são os mesmos, o processo 250 se move para uma posição de decisão 274 para determinar se há mais caracteres em qualquer uma das sequências para serem lidos. Se não houver mais caracteres para serem lidos, então o processo 250 se move para uma posição 276 em que o nível de homologia entre a primeira e a segunda sequências é exibido para o usuário. O nível de homologia é determinado através do cálculo da proporção de caracteres entre as sequências que eram os mesmos do número total de sequências na primeira sequência. Assim, se cada caractere em uma primeira sequência de 100 nucleotídeos tiver se alinhado com cada caractere em uma segunda sequência, o nível de homologia seria de 100%.

[00135] Alternativamente, o programa de computador pode comparar uma sequência de referência com uma sequência da invenção para determinar se as sequências diferem em uma ou mais posições. O programa pode registrar o comprimento e a identidade de nucleotídeos ou de resíduos de aminoácidos inseridos, deletados ou substituídos em relação à sequência da referência ou da invenção. O programa de computador pode ser um programa que determina se uma sequência de referência contém um polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) em relação a uma sequência da invenção ou, se uma sequência da invenção compreende um SNP de uma sequência conhecida. Assim, em alguns aspectos, o programa de computador é um programa que identifica SNPs. O método pode ser implementado através dos sistemas de computador descritos anteriormente e do método

ilustrado na Figura 3. O método pode ser realizado através da leitura de uma sequência da invenção e das sequências de referência através do uso do programa de computador e da identificação de diferenças com o programa de computador.

[00136] Em outros aspectos, o sistema baseado no computador compreende um identificador para a identificação de características dentro de um ácido nucleico ou um polipeptídeo da invenção. Um "identificador" refere-se a um ou mais programas que identificam certas características dentro de uma sequência de ácido nucleico. Por exemplo, um identificador pode compreender um programa que identifica um quadro aberto de leitura (ORF) em uma sequência de ácido nucleico. A Figura 4 é um diagrama de fluxo que ilustra um aspecto de um processo de identificação 300 para a detecção da presença de uma característica em uma sequência. O processo 300 começa em uma posição de início 302 e então se move para uma posição 304 em que uma primeira sequência que será verificada em relação às características é armazenada em uma memória 115 no sistema de computador 100. O processo 300 então se move para uma posição 306 em que um banco de dados de características de sequências é aberto. Tal banco de dados incluiria uma lista de cada atributo das características junto com o nome da característica. Por exemplo, um nome de característica poderia ser "Códon de Início" e o atributo seria "ATG". Um outro exemplo seria o nome da característica "TAATAA Box" o atributo da característica seria "TAATAA". Um exemplo de tal banco de dados é produzido pela University of Wisconsin Genetics Computer Group. Alternativamente, as características podem ser motivos estruturais de polipeptídeos tais como alfa hélices, folhas beta ou motivos funcionais de polipeptídeos tais como sítios ativos enzimáticos, motivos de hélice-volta-hélice ou outros motivos

conhecidos pelos versados na técnica. Uma vez que o banco de dados de características é aberto na posição 306, o processo 300 se move para uma posição 308 em que a primeira característica é lida partindo do banco de dados. É feita então uma comparação do atributo da primeira característica com a primeira sequência em uma posição 310. É feita então uma determinação em uma posição de decisão 316 se o atributo da característica foi observado na primeira sequência. Se o atributo foi observado, então o processo 300 se move para uma posição 318 em que o nome da característica observada é exibido para o usuário. O processo 300 então se move para uma posição de decisão 320 em que é feita uma determinação se há mais características no banco de dados. Se não houver mais características, então o processo 300 termina em uma posição final 324. Entretanto, se houver mais características no banco de dados, então o processo 300 lê a característica de sequência seguinte em uma posição 326 e o processo ocorre repetidamente de volta para a posição 310 em que o atributo da característica seguinte é comparado contra a primeira sequência. Se o atributo da característica não for observado na primeira sequência na posição de decisão 316, o processo 300 se move diretamente para a posição de decisão 320 para determinar se quaisquer mais características existem no banco de dados. Assim, em um aspecto, a invenção fornece um programa de computador que identifica quadros abertos de leitura (ORFs).

[00137] Uma sequência de polipeptídeo ou de ácido nucleico da invenção pode ser gravada e manipulada em uma variedade de programas de processamento de dados em uma variedade de formatos. Por exemplo, uma sequência pode ser gravada na forma de texto em um arquivo de processamento de palavras, tal como MicrosoftWORD ou WORDPERFECT ou na forma de um arquivo ASCII em uma variedade de programas de

bancos de dados familiares aos versados na técnica, tal como DB2, SYBASE ou ORACLE. Em adição, muitos programas de computador e bancos de dados podem ser utilizados como algoritmos de comparação de sequências, identificadores ou fontes de sequências de nucleotídeos ou sequências de polipeptídeos de referência que serão comparadas com uma sequência de ácido nucleico da invenção. Os programas e os bancos de dados utilizados na prática da invenção incluem, mas não-estão limitados a: MacPattern (EMBL), DiscoveryBase (Molecular Applications Group), GeneMine (Molecular Applications Group), Look (Molecular Applications Group), MacLook (Molecular Applications Group), BLAST e BLAST2 (NCBI), BLASTN e BLASTX (Altschul e outros, J. Mol. Biol. 215: 403, 1990), FASTA (Pearson e Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 2444, 1988), FASTDB (Brutlag e outros Comp. App. Biosci. 6:237-245, 1990), Catalyst (Molecular Simulations Inc.), Catalyst/SHAPE (Molecular Simulations Inc.), Cerius2,DBAccess (Molecular Simulations Inc.), HypoGen (Molecular Simulations Inc.), Insight II, (Molecular Simulations Inc.), Discover (Molecular Simulations Inc.), CHARMM (Molecular Simulations Inc.), Felix (Molecular Simulations Inc.), DelPhi, (Molecular Simulations Inc.), QuanteMM, (Molecular Simulations Inc.), Homology (Molecular Simulations Inc.), Modeler (Molecular Simulations Inc.), ISIS (Molecular Simulations Inc.), Quanta/Protein Design (Molecular Simulations Inc.), WebLab (Molecular Simulations Inc.), WebLab Diversity Explorer (Molecular Simulations Inc.), Gene Explorer (Molecular Simulations Inc.), SeqFold (Molecular Simulations Inc.), o banco de dados MDL Available Chemicals Directory, o banco de dados MDL Drug Data Report, o banco de dados Comprehensive Medicinal Chemistry, o banco de dados Derwent's World Drug Index, o banco de dados BioByteMasterFile, o banco de dados

Genbank e o banco de dados Genseqn. Muitos outros programas e bancos de dados serão evidentes para um versado na técnica fornecida a presente divulgação.

[00138] Os motivos que podem ser detectados utilizando os programas anteriores incluem sequências que codificam zíperes de leucina, motivos de hélice-volta-hélice, sítios de glicosilação, sítios de ubiquitinação, alfa hélices e folhas beta, sequências sinais que codificam peptídeos sinais que direcionam a secreção de proteínas codificadas, sequências implicadas na regulação da transcrição tais como homeoboxes, fitas ácidos, sítios ativos enzimáticos, sítios de ligação ao substrato e sítios de clivagem enzimática.

Inibição da Expressão de uma Fitase

[00139] A invenção fornece ainda ácidos nucleicos complementares (por exemplo, sequências antissenso) às sequências de ácidos nucleicos da invenção, incluindo ácidos nucleicos que compreendem antissenso, iRNA, ribozimas. As sequências antissenso são capazes de inibir o transporte, o processamento e a transcrição dos genes que codificam a fitase. A inibição pode ser realizada através do direcionamento do DNA genômico ou do RNA mensageiro. A transcrição ou a função do ácido nucleico direcionado pode ser inibida, por exemplo, através de hibridização e/ou clivagem. Um conjunto particularmente útil de inibidores fornecidos pela presente invenção inclui oligonucleotídeos que são capazes de se ligar ao gene ou a mensagem da fitase, em qualquer um dos casos prevenindo ou inibindo a produção ou a função da enzima fitase. A associação pode ser através de hibridização específica à sequência. Uma outra classe útil de inibidores inclui oligonucleotídeos que causam a inativação ou a clivagem da mensagem da fitase. O oligonucleotídeo pode ter atividade enzimática que causa tal clivagem, tal como ribozimas. O oligonucleotídeo pode ser

quimicamente modificado ou conjugado com uma enzima ou uma composição capaz de clivar o ácido nucleico complementar. Pode ser verificado um conjunto de muitos tais oligonucleotídeos diferentes em relação aqueles com a atividade desejada.

Oligonucleotídeos Antissenso

[00140] A invenção fornece oligonucleotídeos antissenso que compreendem as novas modificações de sequências de fitase da invenção, em que estes oligonucleotídeos antissenso são capazes de se ligar à mensagem da fitase o que pode inibir a atividade da fitase através do direcionamento ao mRNA. As estratégias para o planejamento de oligonucleotídeos antissenso são bem descritas na literatura científica e de patentes e o versado na técnica pode planejar tais oligonucleotídeos de fitase utilizando os novos reagentes da invenção. Por exemplo, os protocolos de "gene walking"/mapeamento de RNA para verificar oligonucleotídeos antissenso eficientes são bem conhecidos na técnica, ver, por exemplo, Ho (2000) *Methods Enzymol.* 314:168-183, que descreve um ensaio de mapeamento de RNA, que se baseia nas técnicas moleculares padronizadas para fornecer um método fácil e confiável para a seleção de sequências antissenso potentes. Ver, também Smith (2000) *Euro. J. Pharm. Sci.* 11:191-198.

[00141] Os ácidos nucleicos que ocorrem naturalmente são utilizados como oligonucleotídeos antissenso. Os oligonucleotídeos antissenso também podem ter qualquer comprimento; por exemplo, em aspectos alternativos, os oligonucleotídeos antissenso têm entre aproximadamente 5 até 100, aproximadamente 10 até 80, aproximadamente 15 até 60, aproximadamente 18 até 40. O comprimento ótimo pode ser determinado através de classificação de rotina. Os oligonucleotídeos antissenso podem estar

presentes em qualquer concentração. A concentração ótima pode ser determinada através de classificação de rotina. É conhecida uma ampla variedade de análogos de nucleotídeos e de ácidos nucleicos que não ocorrem naturalmente sintéticos que podem ser direcionados para este problema potencial. Por exemplo, os ácidos nucleicos peptídicos (PNAs) que contêm estruturas não iônicas, tais como unidades de N-(2-aminoetil) glicina podem ser utilizados. Os oligonucleotídeos antissenso que possuem ligações fosforotioato também podem ser utilizados, como descrito em WO 97/03211; WO 96/39154; Mata (1997) Toxicol Appl Pharmacol 144:189-197; Antisense Therapeutics, ed. Agarwal (Humana Press, Totowa, N.J., 1996). Os oligonucleotídeos antissenso que possuem análogos de estruturas de DNA sintéticos fornecidos pela invenção podem incluir ainda ácidos nucleicos fosforoditioatos, metilfosfonatos, fosforamidatos, alquil fosfotriésteres, sulfamatos, 3'-tioacetais, metileno(metilimino), 3'-N-carbamatos e morfolino carbamatos, como descrito anteriormente.

[00142] A metodologia de química combinatória pode ser utilizada para criar vastos números de oligonucleotídeos que podem ser rapidamente verificados em relação a oligonucleotídeos específicos que possuem afinidades e especificidades de ligação apropriadas em direção a qualquer alvo, tais como as sequências de fitase senso e antissenso da invenção (ver, por exemplo, Gold (1995) J. of Biol. Chem. 270:13581-13584).

Ribozimas Inibidoras

[00143] A invenção fornece ribozimas que compreendem as novas modificações de sequências de fitase da invenção, em que as ribozimas da invenção são capazes de se ligar à mensagem da fitase o que pode inibir a atividade da enzima fitase através do direcionamento ao mRNA. As estratégias para o planejamento de ribozimas e para a seleção de sequência

antissenso específica à fitase para o direcionamento são bem descritas na literatura científica e de patentes e o versado na técnica pode planejar tais ribozimas utilizando os novos reagentes da invenção. As ribozimas atuam através da ligação a um RNA alvo através da parte de ligação ao RNA alvo de uma ribozima que é mantida em proximidade íntima com uma parte enzimática do RNA que cliva o RNA alvo. Assim, a ribozima reconhece e se liga a um RNA alvo através do pareamento de bases complementares e uma vez ligada ao sítio correto, atua enzimaticamente para clivar e inativar o RNA alvo. A clivagem de um RNA alvo de tal maneira destruirá sua capacidade de direcionar a síntese de uma proteína codificada se a clivagem ocorrer na sequência codificadora. Após uma ribozima ter se ligado e clivado seu RNA alvo, esta é tipicamente liberada de tal RNA e assim pode se ligar e clivar novos alvos repetidamente.

[00144] Em algumas circunstâncias, a natureza enzimática de uma ribozima pode ser vantajosa em relação a outras tecnologias, tal como a tecnologia antissenso (em que uma molécula de ácido nucleico simplesmente se liga a um ácido nucleico alvo para bloquear sua transcrição, tradução ou associação com uma outra molécula) uma vez que a concentração eficiente de ribozima necessária para realizar um tratamento terapêutico pode ser menor que a de um oligonucleotídeo antissenso. Esta vantagem potencial reflete a capacidade da ribozima de atuar enzimaticamente. Assim, uma única molécula de ribozima é capaz de clivar muitas moléculas de RNA alvo. Em adição, uma ribozima é tipicamente um inibidor altamente específico, com a especificidade de inibição dependendo não somente do mecanismo de pareamento de bases, mas também do mecanismo através do qual a molécula inibe a expressão do RNA ao qual se liga. Em outras palavras, a inibição é causada pela clivagem do RNA alvo e

assim a especificidade é definida como a proporção da taxa de clivagem do RNA alvo em relação à taxa de clivagem do RNA que não é alvo. Este mecanismo de clivagem é dependente de fatores adicionais aos envolvidos no pareamento de bases. Assim, a especificidade de ação de uma ribozima pode ser maior que a do oligonucleotídeo antissenso que se liga ao mesmo sítio de RNA. A molécula de RNA de ribozima enzimática pode ser formada em um motivo em cabeça de martelo, mas pode também ser formada no motivo em grampo de cabelo, vírus da hepatite delta, íntron do grupo I ou RNA similar a RNaseP (em associação a uma sequência guia de RNA). Os exemplos de tais motivos em cabeça de martelo são descritos por Rossi (1992) *Aids Research and Human Retroviruses* 8:183; motivos em grampo de cabelo por Hampel (1989) *Biochemistry* 28:4929 e Hampel (1990) *Nuc. Acids Res.* 18:299; o motivo do vírus da hepatite delta por Perrotta (1992) *Biochemistry* 31:16; o motivo da RNaseP por Guerrier-Takada (1983) *Cell* 35:849; e o íntron do grupo I por Cech Patente U.S. No 4.987.071. Não é pretendido que a apresentação destes motivos específicos seja limitante; os versados na técnica reconhecerão que uma molécula de RNA enzimática desta invenção possui um sítio de ligação ao substrato específico complementar a uma ou mais das regiões de RNA do gene-alvo e possui sequência de nucleotídeos dentro ou ao redor de tal sítio de ligação ao substrato que confere uma atividade de clivagem de RNA à molécula.

Interferência de RNA (RNAi)

[00145] Em um aspecto, a invenção fornece uma molécula inibidora de RNA, uma assim chamada molécula de "RNAi", que compreende uma sequência de enzima da invenção. A molécula de RNAi compreende uma molécula de RNA de fita dupla (dsRNA). A molécula de RNAi, por exemplo, siRNA e/ou miRNA, pode inibir a expressão do gene da enzima

fitase. Em um aspecto, a molécula de RNAi, por exemplo, siRNA e/ou miRNA, tem aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 ou mais nucleotídeos do duplex de comprimento.

[00146] Embora a invenção não-esteja limitada a qualquer mecanismo de ação particular, o RNAi pode entrar em uma célula e causar a degradação de um RNA de fita simples (ssRNA) de sequências similares ou idênticas, incluindo mRNAs endógenos. Quando uma célula é exposta ao RNA de fita dupla (dsRNA), o mRNA do gene homólogo é degradado seletivamente através de um processo chamado de interferência de RNA (RNAi). Um mecanismo básico possível por trás da RNAi é a quebra de um RNA de fita dupla (dsRNA) que se combina com uma sequência gênica específica em pedaços pequenos chamados de RNA interferente curto, que ativam a degradação do mRNA que se combina com sua sequência. Em um aspecto, os RNAi's da invenção são utilizados em agentes terapêuticos para silenciamento gênico, ver, por exemplo, Shuey (2002) Drug Discov. Today 7:1040-1046. Em um aspecto, a invenção fornece métodos para degradar seletivamente o RNA utilizando as moléculas de RNAi, por exemplo, siRNA e/ou miRNA, da invenção. Em um aspecto, o RNA microinibidor (miRNA) inibe a tradução e o siRNA inibe a transcrição. O processo pode ser praticado in vitro, ex vivo ou in vivo. Em um aspecto, as moléculas de RNAi da invenção podem ser utilizadas para gerar uma mutação de perda de função em uma célula, um órgão ou um animal. Os métodos para produzir e utilizar moléculas de RNAi, por exemplo, siRNA e/ou miRNA, para degradar seletivamente o RNA são bem conhecidos na técnica, ver, por exemplo, as Patentes U.S. N°s 6.506.559; 6.511.824; 6.515.109; 6.489.127.

Modificação de Ácidos Nucleicos

[00147] A invenção fornece métodos de produção de variações dos

ácidos nucleicos da invenção, por exemplo, daqueles que codificam uma enzima fitase. Estes métodos podem ser repetidos ou utilizados em várias combinações para gerar enzimas fitases que possuem uma atividade alterada ou diferente ou uma estabilidade alterada ou diferente daquela de uma fitase codificada pelo ácido nucleico molde. Estes métodos também podem ser repetidos ou utilizados em várias combinações, por exemplo, para gerar variações na expressão gênica/de mensagem, na tradução da mensagem ou na estabilidade da mensagem. Em um outro aspecto, a composição genética de uma célula é alterada, por exemplo, através da modificação de um gene homólogo ex vivo, seguida por sua reinserção na célula.

[00148] A invenção fornece ainda métodos para alterar as características de uma fitase da invenção através de mutagênese e outro método, incluindo a evolução direcionada, por exemplo, as abordagens de propriedade da Diversa Corporation (San Diego, CA); por exemplo, DirectEvolution; (ver, por exemplo, a Patente U.S. No 5.830.696; Mutagênese por Saturação no Sítio Gênico (GSSM) (ver, por exemplo, as Patentes U.S. Nos 6.171.820 e 6.579.258), Montagem Gênica Mediada por Exonucleases na Evolução Direcionada (ver, por exemplo, as Patentes U.S. Nos 6.361.974 e 6.352.842), Seleção Final na Evolução Direcionada (ver, por exemplo, as Patentes U.S. Nos 6.358.709 e 6.238.884), Embaralhamento com Síntese Baseada na Recombinação (ver, por exemplo, as Patentes U.S. Nos 5.965.408 e 6.440.668 e a Patente Australiana No AU724521) e Evolução Direcionada de Enzimas Termofílicas (ver, por exemplo, as Patentes U.S. Nos 5.830.696 e 6.335.179).

[00149] Em um aspecto, as características de uma fitase são modificadas através de um protocolo DirectEvolution que compreende: a) submeter um ou mais moldes moleculares, por exemplo, os ácidos nucleicos

de fitase da invenção, à mutagênese para gerar novas moléculas e b) selecionar entre estas espécies da progênie novas moléculas com características mais desejáveis. O poder da evolução direcionada depende da escolha inicial dos moldes de partida (por exemplo, a SEQ ID NO: 1 "original" ou qualquer sequência desta invenção), assim como do(s) processo(s) de mutagênese escolhido(s) e do(s) processo(s) de classificação utilizado(s). Assim, a invenção fornece novas fontes altamente ativas, fisiologicamente eficientes e econômicas de atividade de fitase, incluindo novas fitases que: a) possuem atividades superiores sob uma ou mais aplicações específicas, tal como produção de matérias alimentícias a altas temperaturas e são assim úteis para otimizar estas aplicações específicas; b) são úteis como moldes para a evolução direcionada para conseguir novas moléculas ainda mais melhoradas; e c) são úteis como ferramentas para a identificação de moléculas relacionadas adicionais através de meios tais como abordagens baseadas na hibridização.

[00150] Um ácido nucleico da invenção pode ser alterado através de quaisquer meios. Por exemplo, métodos aleatórios ou estocásticos ou, métodos não-estocásticos ou de "evolução direcionada". Os métodos para mutação aleatória dos genes são bem conhecidos na técnica, ver, por exemplo, a Patente U.S. No 5.830.696. Por exemplo, agentes mutagênicos podem ser utilizados para mutar aleatoriamente um gene. Os agentes mutagênicos incluem, por exemplo, luz ultravioleta ou irradiação gama ou um agente mutagênico químico, por exemplo, mitomicina, ácido nitroso, psoralenos fotoativados, isoladamente ou em combinação, para induzir quebras no DNA susceptíveis ao reparo por recombinação. Outros agentes mutagênicos químicos incluem, por exemplo, bissulfito de sódio, ácido nitroso, hidroxilamina, hidrazina ou ácido fórmico. Outros agentes

mutagênicos são análogos de precursores de nucleotídeos, por exemplo, nitrosoguanidina, 5-bromouracil, 2-aminopurina ou acridina. Estes agentes podem ser adicionados a uma reação de PCR no lugar do precursor de nucleotídeo levando assim à mutação da sequência. Também podem ser utilizados agentes intercalantes tais como a proflavina, a acriflavina, a quinacrina e similares.

[00151] Qualquer técnica na biologia molecular pode ser utilizada, por exemplo, mutagênese por PCR aleatória, ver, por exemplo, Rice (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5467-5471; ou, mutagênese combinatória com vários cassetes, ver, por exemplo, Cramer (1995) Biotechniques 18:194-196. Alternativamente, os ácidos nucleicos, por exemplo, os genes, podem ser reorganizados após fragmentação aleatória ou "estocástica", ver, por exemplo, as Patentes U.S. Nos 6.291.242; 6.287.862; 6.287.861; 5.955.358; 5.830.721; 5.824.514; 5.811.238; 5.605.793. Em aspectos alternativos, as modificações, as adições ou as deleções são introduzidas através de PCR propensa a erros, embaralhamento, mutagênese direcionada por oligonucleotídeo, PCR de montagem, mutagênese por PCR sexual, mutagênese in vivo, mutagênese por cassete, mutagênese de conjunto recursivo, mutagênese de conjunto exponencial, mutagênese específica ao sítio, rearranjo gênico, mutagênese por saturação no sítio gênico (GSSM), remontagem por ligação sintética (SLR), recombinação, recombinação de sequências recursivas, mutagênese de DNA modificado por fosfotioato, mutagênese com molde contendo uracila, mutagênese de duplex contendo espaços, mutagênese de reparo de pareamentos errados pontuais, mutagênese de cepas hospedeiras deficientes em relação ao reparo, mutagênese química, mutagênese radiogênica, mutagênese por deleção, mutagênese por seleção de restrição, mutagênese por purificação de

restrição, síntese de genes artificiais, mutagênese de conjunto, criação de multímeros de ácidos nucleicos quiméricos e/ou uma combinação destes e outros métodos.

[00152] As publicações a seguir descrevem uma variedade de procedimentos e/ou métodos de recombinação recursiva que podem ser incorporados nos métodos da invenção: Stemmer (1999) "Molecular breeding of viruses for targeting and other clinical properties" *Tumor Targeting* 4:1-4; Ness (1999) *Nature Biotechnology* 17:893-896; Chang (1999) "Evolution of a cytokine using DNA family shuffling" *Nature Biotechnology* 17:793-797; Minshull (1999) "Protein evolution by molecular breeding" *Current Opinion in Chemical Biology* 3:284-290; Christians (1999) "Directed evolution of thymidine kinase for AZT phosphorylation using DNA family shuffling" *Nature Biotechnology* 17:259-264; Crameri (1998) "DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution" *Nature* 391:288-291; Crameri (1997) "Molecular evolution of an arsenate detoxification pathway by DNA shuffling", *Nature Biotechnology* 15:436-438; Zhang (1997) "Directed evolution of an effective fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4504-4509; Patten e outros (1997) "Applications of DNA Shuffling to Pharmaceuticals and Vaccines" *Current Opinion in Biotechnology* 8:724-733; Crameri e outros (1996) "Construction and evolution of antibody-phage libraries by DNA shuffling" *Nature Medicine* 2:100-103; Crameri e outros (1996) "Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling" *Nature Biotechnology* 14:315-319; Gates e outros (1996) "Affinity selective isolation of ligands from peptide libraries through display on a lac repressor 'headpiece dimer'" *Journal of Molecular Biology* 255:373-386; Stemmer

(1996) "Sexual PCR and Assembly PCR" Em: The Encyclopedia of Molecular Biology. VCH Publishers, Nova York. pp.447-457; Cramer e Stemmer (1995) "Combinatorial multiple cassette mutagenesis creates all the permutations of mutant and wildtype cassettes" *Biotechniques* 18:194-195; Stemmer e outros (1995) "Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides" *Gene*, 164:49-53; Stemmer (1995) "The Evolution of Molecular Computation" *Science* 270: 1510; Stemmer (1995) "Searching Sequence Space" *Bio/Technology* 13:549-553; Stemmer (1994) "Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling" *Nature* 370:389-391; e Stemmer (1994) "DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751.

[00153] Os métodos de mutação para gerar diversidade incluem, por exemplo, mutagênese direcionada ao sítio (Ling e outros (1997) "Approaches to DNA mutagenesis: an overview" *Anal Biochem.* 254(2): 157-178; Dale e outros (1996) "Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the fosforotioato method" *Methods Mol. Biol.* 57:369-374; Smith (1985) "In vitro mutagenesis" *Ann. Rev. Genet.* 19:423-462; Botstein & Shortle (1985) "Strategies and applications of in vitro mutagenesis" *Science* 229:1193-1201; Carter (1986) "Site-directed mutagenesis" *Biochem. J.* 237:1-7; e Kunkel (1987) "The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis" em *Nucleic Acids & Molecular Biology* (Eckstein, F. e Lilley, D. M. J. eds., Springer Verlag, Berlin)); mutagênese utilizando moldes contendo uracila (Kunkel (1985) "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492; Kunkel e outros (1987) "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection" *Methods in*

Enzymol. 154, 367-382; e Bass e outros (1988) "Mutant Trp repressors with new DNA-binding specificities" Science 242:240-245); mutagênese direcionada por oligonucleotídeo (Methods in Enzymol. 100: 468-500 (1983); Methods in Enzymol. 154: 329-350 (1987); Zoller & Smith (1982) "Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any DNA fragment" Nucleic Acids Res. 10:6487-6500; Zoller & Smith (1983) "Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors" Methods in Enzymol. 100:468-500; e Zoller & Smith (1987) "Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template" Methods in Enzymol. 154:329-350); mutagênese de DNA modificado por fosforotioato (Taylor e outros (1985) "The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA" Nucl. Acids Res. 13: 8749-8764; Taylor e outros (1985) "The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA" Nucl. Acids Res. 13: 8765-8787 (1985); Nakamaye (1986) "Inhibition of restriction endonuclease Nci I cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis" Nucl. Acids Res. 14: 9679-9698; Sayers e outros (1988) "Y-T Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis" Nucl. Acids Res. 16:791-802; e Sayers e outros (1988) "Strand specific cleavage of phosphorothioate-containing DNA by reaction with restriction endonucleases in the presence of ethidium bromide" Nucl. Acids Res. 16: 803-814); mutagênese utilizando DNA em duplex contendo espaços (Kramer e outros (1984) "The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction" Nucl. Acids Res. 12: 9441-

9456; Kramer & Fritz (1987) *Methods in Enzymol.* "Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA" 154:350-367; Kramer e outros (1988) "Improved enzymatic in vitro reactions in the gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed construction of mutations" *Nucl. Acids Res.* 16: 7207; e Fritz e outros (1988) "Oligonucleotide-directed construction of mutations: a gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions in vitro" *Nucl. Acids Res.* 16: 6987-6999).

[00154] Protocolos adicionais utilizados nos métodos da invenção incluem o reparo de pareamentos errados pontuais (Kramer (1984) "Point Mismatch Repair" *Cell* 38:879-887), a mutagênese utilizando cepas hospedeiras deficientes em relação ao reparo (Carter e outros (1985) "Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors" *Nucl. Acids Res.* 13: 4431-4443; e Carter (1987) "Improved oligonucleotide-directed mutagenesis using M13 vectores" *Methods in Enzymol.* 154: 382-403), a mutagênese por deleção (Eghtedarzadeh (1986) "Use of oligonucleotides to generate large deletions" *Nucl. Acids Res.* 14: 5115), a seleção por restrição e a purificação por restrição (Wells e outros (1986) "Importance of hydrogen-bond formation in stabilizing the transition state of subtilisin" *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* 317: 415-423), a mutagênese através da síntese gênica total (Nambiar e outros (1984) "Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein" *Science* 223: 1299-1301; Sakamar e Khorana (1988) "Total synthesis and expression of a gene for the α -subunit of bovine rod outer segment guanine nucleotide-binding protein (transducin)" *Nucl. Acids Res.* 14: 6361-6372; Wells e outros (1985) "Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites" *Gene* 34:315-323; e Grundstrom e outros (1985)

"Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale 'shot-gun' gene synthesis" Nucl. Acids Res. 13: 3305-3316), o reparo de quebras de fita dupla (Mandecki (1986); Arnold (1993) "Protein engineering for unusual environments" Current Opinion in Biotechnology 4:450-455, "Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of Escherichia coli: a method for site-specific mutagenesis" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:7177-7181).

[00155] Detalhes adicionais ou protocolos alternativos de muitos dos métodos anteriores podem ser encontrados em Methods in Enzymology Volume 154, que também descreve controles úteis para resolver problemas de vários métodos de mutagênese. Ver, também a Patente U.S. Nº 5.605.793 a Stemmer (25 de fevereiro de 1997), "Methods for In Vitro Recombination"; Patente U.S. Nº 5.811.238 a Stemmer e outros (22 de setembro de 1998) "Methods for Generating Polynucleotides having Desired Characteristics by Iterative Selection and Recombination"; Patente U.S. Nº 5.830.721 a Stemmer e outros (3 de novembro de 1998), "DNA Mutagenesis by Random Fragmentation and Reassembly"; Patente U.S. Nº 5.834.252 a Stemmer e outros (10 de novembro de 1998) "End-Complementary Polymerase Reaction"; Patente U.S. Nº 5.837.458 a Minshull e outros (17 de novembro de 1998), "Methods and Compositions for Cellular and Metabolic Engineering"; WO 95/22625, Stemmer e Crameri, "Mutagenesis by Random Fragmentation and Reassembly"; WO 96/33207 por Stemmer e Lipschutz "End Complementary Polymerase Chain Reaction"; WO 97/20078 por Stemmer e Crameri "Methods for Generating Polynucleotides having Desired Characteristics by Iterative Selection and Recombination"; WO 97/35966 por Minshull e Stemmer, "Methods and Compositions for Cellular and Metabolic Engineering"; WO 99/41402 por Punnonen e outros

"Targeting of Genetic Vaccine Vectors"; WO 99/41383 por Punnonen e outros "Antigen Library Immunization"; WO 99/41369 por Punnonen e outros "Genetic Vaccine Vector Engineering"; WO 99/41368 por Punnonen e outros "Optimization of Immunomodulatory Properties of Genetic Vaccines"; EP 752008 por Stemmer e Crameri, "DNA Mutagenesis by Random Fragmentation and Reassembly"; EP 0932670 por Stemmer "Evolving Cellular DNA Uptake by Recursive Sequence Recombination"; WO 99/23107 por Stemmer e outros, "Modification of Virus Tropism and Host Range by Viral Genome Shuffling"; WO 99/21979 por Apt e outros, "Human Papillomavirus vectors"; WO 98/31837 por del Cardayre e outros "Evolution of Whole Cells and Organisms by Recursive Sequence Recombination"; WO 98/27230 por Patten e Stemmer, "Methods and Compositions for Polypeptide Engineering"; WO 98/27230 por Stemmer e outros, "Methods for Optimization of Gene Therapy by Recursive Sequence Shuffling and Selection", WO 00/00632, "Methods for Generating Highly Diverse Libraries", WO 00/09679, "Methods for Obtaining in Vitro Recombined Polynucleotide Sequence Banks and Resulting Sequences", WO 98/42832 por Arnold e outros, "Recombination of Polynucleotide Sequences Using Random or Defined Primers", WO 99/29902 por Arnold e outros, "Method for Creating Polynucleotide and Polypeptide Sequences", WO 98/41653 por Vind, "An in Vitro Method for Construction of a DNA Library", WO 98/41622 por Borchert e outros, "Method for Constructing a Library Using DNA Shuffling" e WO 98/42727 por Pati e Zarling, "Sequence Alterations using Homologous Recombination".

[00156] Os Pedidos de Patentes U.S. fornecem detalhes adicionais ou protocolos alternativos em relação a vários métodos que geram diversidade, incluindo "SHUFFLING OF CODON ALTERED GENES" por Patten e

outros depositado em 28 de setembro de 1999, (U.S. No de Série 09/407.800); "EVOLUTION OF WHOLE CELLS AND ORGANISMS BY RECURSIVE SEQUENCE RECOMBINATION" por del Cardayre e outros, depositado em 15 de julho de 1998 (U.S. No de Série 09/166.188) e 15 de julho de 1999 (U.S. No de Série 09/354.922); "OLIGONUCLEOTIDE MEDIATED NUCLEIC ACID RECOMBINATION" por Crameri e outros, depositado em 28 de setembro de 1999 (U.S. No de Série 09/408.392) e "OLIGONUCLEOTIDE MEDIATED NUCLEIC ACID RECOMBINATION" por Crameri e outros, depositado em 18 de janeiro de 2000 (PCT/US00/01203); "USE OF CODON-VARIED OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS FOR SYNTHETIC SHUFFLING" por Welch e outros, depositado em 28 de setembro de 1999 (U.S. No de Série 09/408.393); "METHODS FOR MAKING CHARACTER STRINGS, POLYNUCLEOTIDES & POLYPEPTIDES HAVING DESIRED CHARACTERISTICS" por Selifonov e outros, depositado em 18 de janeiro de 2000, (PCT/US00/01202) e, por exemplo, "METHODS FOR MAKING CHARACTER STRINGS, POLYNUCLEOTIDES & POLYPEPTIDES HAVING DESIRED CHARACTERISTICS" por Selifonov e outros, depositado em 18 de julho de 2000 (U.S. No de Série 09/618.579); "METHODS OF POPULATING DATA STRUCTURES FOR USE IN EVOLUTIONARY SIMULATIONS" por Selifonov e Stemmer, depositado em 18 de janeiro de 2000 (PCT/US00/01138); e "SINGLE-STRANDED NUCLEIC ACID TEMPLATE-MEDIATED RECOMBINATION AND NUCLEIC ACID FRAGMENT ISOLATION" por Affholter, depositado em 6 de setembro de 2000 (U.S. No de Série 09/656.549).

[00157] Os métodos não-estocásticos ou de "evolução direcionada" incluem, por exemplo, a mutagênese por saturação no sítio gênico (GSSM),

a remontagem por ligação sintética (SLR) ou uma combinação dos mesmos é utilizada para modificar os ácidos nucleicos da invenção para gerar fitases com propriedades novas ou alteradas (por exemplo, atividade sob condições altamente ácidas ou alcalinas, temperaturas altas ou baixas e similares). Os polipeptídeos codificados pelos ácidos nucleicos modificados podem ser verificados em relação a uma atividade antes do teste em relação a uma atividade de fitase ou outra. Qualquer modalidade ou protocolo de teste pode ser utilizado, por exemplo, utilizando uma plataforma de arranjos de capilares. Ver, por exemplo, as Patentes U.S. Nos 6.361.974; 6.280.926; 5.939.250.

Mutagênese por saturação ou GSSM

[00158] A invenção fornece ainda métodos para a produção de enzima utilizando a Mutagênese por Saturação no Sítio Gênico ou, GSSM, como descrito aqui e também nas Patentes U.S. N°s 6.171.820 e 6.579.258.

[00159] Em um aspecto, iniciadores de códons contendo uma sequência N,N,G/T degenerada são utilizados para introduzir mutações pontuais em um polinucleotídeo, por exemplo, uma enzima fitase ou um anticorpo da invenção, de forma a gerar um conjunto de polipeptídeos da progênie em que uma faixa completa de substituições de aminoácidos isolados é representada em cada posição de aminoácido, por exemplo, um resíduo de aminoácido em um sítio ativo da enzima ou um sítio de ligação ao ligante direcionado para ser modificado. Estes oligonucleotídeos podem compreender uma primeira sequência homóloga contígua, uma sequência N,N,G/T degenerada e, opcionalmente, uma segunda sequência homóloga. Os produtos da tradução da progênie a jusante provenientes do uso de tais oligonucleotídeos incluem todas as alterações de aminoácidos possíveis em cada sítio de aminoácido ao longo do polipeptídeo, porque a degeneração da

sequência N,N,G/T inclui códons para todos os 20 aminoácidos. Em um aspecto, um tal oligonucleotídeo degenerado (que compreende, por exemplo, um cassete N,N,G/T degenerado) é utilizado para submeter cada códon original em um molde de polinucleotídeo parental a uma faixa completa de substituições de códons. Em um outro aspecto, pelo menos dois cassetes degenerados são utilizados – no mesmo oligonucleotídeo ou não, para submeter pelo menos dois códons originais em um molde de polinucleotídeo parental a uma faixa completa de substituições de códons. Por exemplo, mais de uma sequência N,N,G/T pode estar contida em um oligonucleotídeo para introduzir mutações de aminoácidos em mais de um sítio. Este grande número de sequências N,N,G/T pode ser diretamente contíguo ou separado por uma ou mais sequências de nucleotídeos adicionais. Em um outro aspecto, os oligonucleotídeos úteis para introduzir adições e deleções podem ser utilizados isoladamente ou em combinação com os códons que contêm uma sequência N,N,G/T, para introduzir qualquer combinação ou permutação de adições, deleções e/ou substituições de aminoácidos.

[00160] Em um aspecto, a mutagênese simultânea de duas ou mais posições de aminoácidos contíguos é feita utilizando um oligonucleotídeo que contém tripletos de N,N,G/T contíguos, isto é, uma sequência (N,N,G/T) n degenerada. Em um outro aspecto, são utilizados cassetes degenerados que possuem menor degeneração que a sequência N,N,G/T. Por exemplo, pode ser desejável em alguns casos utilizar (por exemplo, em um oligonucleotídeo) uma sequência em tripleto degenerada que compreende apenas um N, em que o dito N pode estar na primeira, na segunda ou na terceira posição do tripleto. Quaisquer outras bases incluindo quaisquer combinações e permutações das mesmas podem ser utilizadas nas duas posições restantes do tripleto. Alternativamente, pode ser desejável em

alguns casos utilizar (por exemplo, em um oligo) uma sequência de tripleto N,N,N degenerado.

[00161] Em um aspecto, o uso de tripletos degenerados (por exemplo, tripletos N,N,G/T) permite a produção sistemática e fácil de uma faixa completa de aminoácidos naturais possíveis (para um total de 20 aminoácidos) em cada uma e toda posição de aminoácido em um polipeptídeo (em aspectos alternativos, os métodos incluem ainda a produção de menos que todas as substituições possíveis por resíduo de aminoácido ou códon, posição). Por exemplo, para um polipeptídeo de 100 aminoácidos, podem ser geradas 2000 espécies distintas (isto é, 20 aminoácidos possíveis por posição X 100 posições de aminoácidos. Através do uso de um oligonucleotídeo ou de um conjunto de oligonucleotídeos contendo um tripleto N,N,G/T degenerado, 32 sequências individuais podem codificar todos os 20 aminoácidos naturais possíveis. Assim, em um recipiente de reação em que uma sequência de polinucleotídeos parental é submetida à mutagênese por saturação utilizando pelo menos um tal oligonucleotídeo, são gerados 32 polinucleotídeos de progênie distintos que codificam 20 polipeptídeos distintos. Em contraste, o uso de um oligonucleotídeo não-degenerado na mutagênese direcionada ao sítio leva apenas a um produto de polipeptídeo de progênie por recipiente de reação. Os oligonucleotídeos não-degenerados podem ser opcionalmente utilizados em combinação com iniciadores degenerados divulgados; por exemplo, os oligonucleotídeos não-degenerados podem ser utilizados para gerar mutações pontuais específicas em um polinucleotídeo de trabalho. Isto fornece um meio para gerar mutações pontuais silenciosas específicas, mutações pontuais que levam a alterações de aminoácidos correspondentes e mutações pontuais que causam a produção de códons de término e a

expressão correspondente de fragmentos polipeptídicos.

[00162] Em um aspecto, cada recipiente de reação de mutagênese por saturação contém polinucleotídeos que codificam pelo menos 20 moléculas de polipeptídeo de progênie (por exemplo, enzimas fitases) de forma que todos os 20 aminoácidos naturais são representados na posição de aminoácido específica correspondente à posição do códon que sofreu mutagênese no polinucleotídeo parental (outros aspectos utilizam menos que todas as 20 combinações naturais). Os polipeptídeos de progênie degenerados 32 vezes gerados partindo de cada recipiente de reação de mutagênese por saturação podem ser submetidos à amplificação clonal (por exemplo, clonados em um hospedeiro adequado, por exemplo, hospedeiro de *E. coli*, utilizando, por exemplo, um vetor de expressão) e submetidos à classificação através da classificação. Quando um polipeptídeo de progênie individual é identificado através da classificação como exibindo uma alteração favorável em relação à propriedade (quando comparado com o polipeptídeo parental, tal como maior atividade de hidrólise de glucana sob condições alcalinas ou ácidas), este pode ser sequenciado para identificar a substituição de aminoácido favorável correspondente contida no mesmo.

[00163] Em um aspecto, após a mutagênese de cada e toda posição de aminoácido em um polipeptídeo parental utilizando mutagênese por saturação, como divulgado aqui, as alterações favoráveis de aminoácidos podem ser identificadas em mais de uma posição de aminoácido. Pode ser gerada uma ou mais novas moléculas da progênie que contêm uma combinação de todas ou parte destas substituições de aminoácidos favoráveis. Por exemplo, se 2 alterações de aminoácidos favoráveis específicas forem identificadas em cada uma de 3 posições de aminoácidos em um polipeptídeo, as permutações incluem 3 possibilidades em cada

posição (sem alteração no aminoácido original e cada uma das duas alterações favoráveis) e 3 posições. Assim, há 3 x 3 x 3 ou 27 possibilidades totais, incluindo 7 que foram verificadas anteriormente - 6 mutações pontuais isoladas (isto é, 2 em cada uma das três posições) e nenhuma alteração em qualquer posição.

[00164] Ainda em um outro aspecto, mutagênese por saturação no sítio pode ser utilizada junto com o embaralhamento, a quimerização, a recombinação e outros processos de mutagênese, junto com a classificação. Esta invenção fornece o uso de qualquer(qualquer) processo(s) de mutagênese, incluindo a mutagênese por saturação, de uma maneira iterativa. Em um exemplo, o uso iterativo de qualquer(qualquer) processo(s) de mutagênese é feito em combinação com a classificação.

[00165] A invenção fornece ainda o uso de iniciadores de códons de propriedade (contendo uma sequência N,N,N degenerada) para introduzir mutações pontuais em um polinucleotídeo, de forma a gerar um conjunto de polipeptídeos de progênie em que uma faixa completa de substituições de aminoácidos isolados é representada em cada posição de aminoácido (Mutagênese por Saturação no Sítio Gênico (GSSM)). Os oligos utilizados são compreendidos de forma contígua de uma primeira sequência homóloga, uma sequência N,N,N degenerada e em um aspecto, mas não necessariamente, uma segunda sequência homóloga. Os produtos da tradução da progênie a jusante provenientes do uso de tais oligos incluem todas as alterações de aminoácidos possíveis em cada sítio de aminoácido ao longo do polipeptídeo, porque a degeneração da sequência N,N,N inclui códons para todos os 20 aminoácidos.

[00166] Em um aspecto, um tal oligo degenerado (que compreende um cassete N,N,N degenerado) é utilizado para submeter cada códon

original em um molde de polinucleotídeo parental a uma faixa completa de substituições de códons. Em um outro aspecto, pelo menos dois cassetes N,N,N degenerados são utilizados – no mesmo oligo ou não, para submeter pelo menos dois códons originais em um molde de polinucleotídeo parental a uma faixa completa de substituições de códons. Assim, mais de uma sequência N,N,N pode estar contida em um oligo para introduzir mutações de aminoácidos em mais de um sítio. Este grande número de sequências N,N,N pode ser diretamente contíguo ou separado por uma ou mais sequências de nucleotídeos adicionais. Em um outro aspecto, os oligos úteis para introduzir adições e deleções podem ser utilizados isoladamente ou em combinação com os códons que contêm uma sequência N,N,N, para introduzir qualquer combinação ou permutação de adições, deleções e/ou substituições de aminoácidos.

[00167] Em um exemplo particular, é possível submeter à mutagênese simultaneamente duas ou mais posições de aminoácidos contíguas utilizando um oligo que contém tripletos N,N,N contíguos, isto é, uma sequência (N,N,N)_n degenerada.

[00168] Em um outro aspecto, a presente invenção fornece o uso de cassetes degenerados que possuem menor degeneração que a sequência N,N,N. Por exemplo, pode ser desejável em alguns casos utilizar (por exemplo, em um oligo) uma sequência de triplete degenerado que compreende apenas um N, em que o N pode estar na primeira, na segunda ou na terceira posição do triplete. Quaisquer outras bases incluindo quaisquer combinações e permutações das mesmas podem ser utilizadas nas duas posições restantes do triplete. Alternativamente, pode ser desejável em alguns casos utilizar (por exemplo, em um oligo) uma sequência de triplete N,N,N degenerado, N,N,G/T ou uma sequência de triplete N,N, G/C.

[00169] É considerado, entretanto, que o uso de um triplete degenerado (tal como N,N,G/T ou uma sequência de triplete N,N, G/C) que é divulgado na presente invenção é vantajoso por várias razões. Em um aspecto, esta invenção fornece um meio para gerar sistematicamente e bastante facilmente a substituição da faixa completa de aminoácidos possíveis (para um total de 20 aminoácidos) em cada e toda posição de aminoácido em um polipeptídeo. Assim, para um polipeptídeo de 100 aminoácidos, a invenção fornece uma maneira de gerar sistematicamente e bastante facilmente 2000 espécies distintas (isto é, 20 aminoácidos possíveis por posição vezes 100 posições de aminoácidos). É considerado que são fornecidas, através do uso de um oligo que contém um N,N,G/T degenerado ou uma sequência de triplete N,N, G/C, 32 sequências individuais que codificam os 20 aminoácidos possíveis. Assim, em um recipiente de reação em que uma sequência de polinucleotídeos parental é submetida à mutagênese por saturação utilizando um tal oligo, são gerados 32 polinucleotídeos de progênie distintos que codificam 20 polipeptídeos distintos. Em contraste, o uso de um oligo não-degenerado na mutagênese direcionada ao sítio leva a apenas um produto de polipeptídeo de progênie por recipiente de reação.

[00170] Esta invenção fornece ainda o uso de oligos não-degenerados, que podem opcionalmente ser utilizados em combinação com os iniciadores degenerados divulgados. É considerado que em algumas situações, é vantajoso o uso de oligos não-degenerados para gerar mutações pontuais específicas em um polinucleotídeo de trabalho. Isto fornece um meio para gerar mutações pontuais silenciosas específicas, mutações pontuais que levam a alterações de aminoácidos correspondentes e mutações pontuais que causam a produção de códons de término e a expressão correspondente

de fragmentos polipeptídicos.

[00171] Assim, em um aspecto desta invenção, cada recipiente de reação de mutagênese por saturação contém polinucleotídeos que codificam pelo menos 20 moléculas de polipeptídeos de progênie de forma que todos os 20 aminoácidos são representados em uma posição de aminoácido específica que corresponde à posição do códon que sofreu mutagênese no polinucleotídeo parental. Os polipeptídeos de progênie degenerados 32 vezes gerados partindo de cada recipiente de reação de mutagênese por saturação podem ser submetidos à amplificação clonal (por exemplo, clonados em um hospedeiro de *E. coli* adequado utilizando um vetor de expressão) e submetidos à classificação da expressão. Quando um polipeptídeo de progênie individual é identificado através da classificação como exibindo uma alteração favorável em relação à propriedade (quando comparado com o polipeptídeo parental), este pode ser sequenciado para identificar a substituição de aminoácido favorável correspondente contida no mesmo.

[00172] É considerado que após a mutagênese de cada e toda a posição de aminoácido em um polipeptídeo parental utilizando a mutagênese por saturação como divulgado aqui, as alterações de aminoácidos favoráveis podem ser identificadas em mais de uma posição de aminoácido. Pode ser gerada uma ou mais novas moléculas de progênie que contêm uma combinação de todas ou parte destas substituições de aminoácidos favoráveis. Por exemplo, se 2 alterações de aminoácidos favoráveis específicas forem identificadas em cada uma de 3 posições de aminoácidos em um polipeptídeo, as permutações incluem 3 possibilidades em cada posição (nenhuma alteração no aminoácido original e cada um das duas alterações favoráveis) e 3 posições. Assim, há $3 \times 3 \times 3$ ou 27 possibilidades totais, incluindo 7 que foram verificadas anteriormente - 6 mutações

pontuais isoladas (isto é, 2 em cada uma das três posições) e nenhuma alteração em qualquer posição.

[00173] Assim, em um exemplo não-limitante, esta invenção fornece o uso da mutagênese por saturação em combinação com processos de mutagênese adicionais, tais como os processos em que dois ou mais polinucleotídeos relacionados são introduzidos em uma célula hospedeira adequada de forma que um polinucleotídeo híbrido é gerado através de recombinação e de reagrupamento redutivo.

[00174] Em adição à realização da mutagênese ao longo da sequência inteira de um gene, a presente invenção mostra que a mutagênese pode ser utilizada para substituir cada um de qualquer número de bases em uma sequência de polinucleotídeos, em que o número de bases que será submetido à mutagênese é, em um aspecto, cada número inteiro de 15 até 100.000. Assim, ao invés de submeter à mutagênese cada posição ao longo de uma molécula, é possível submeter todas ou um número distinto de bases (em um aspecto um subconjunto que totaliza de 15 até 100.000) à mutagênese. Em um aspecto, um nucleotídeo separado é utilizado para a mutagênese de cada posição ou grupo de posições ao longo de uma sequência de polinucleotídeos. Um grupo de 3 posições que será submetido à mutagênese pode ser um códon. As mutações podem ser introduzidas utilizando um iniciador mutagênico, que contém um cassete heterólogo, também referido como um cassete mutagênico. Os exemplos de cassetes podem ter de 1 até 500 bases. Cada posição de nucleotídeo em tais cassetes heterólogos é N, A, C, G, T, A/C, A/G, A/T, C/G, C/T, G/T, C/G/T, A/G/T, A/C/T, A/C/G ou E, em que E é qualquer base que não seja A, C, G ou T (E pode ser referida como um oligo planejado).

[00175] Em um sentido geral, a mutagênese por saturação é

compreendida da mutagênese de um conjunto completo de cassetes mutagênicos (em que cada cassete tem, em um aspecto, aproximadamente 1-500 bases de comprimento) na sequência de polinucleotídeos definida que será submetida à mutagênese (em que a sequência que será submetida à mutagênese tem, em um aspecto, de aproximadamente 15 até 100.000 bases de comprimento). Assim, um grupo de mutações (variando de 1 até 100 mutações) é introduzido em cada cassete que será submetido à mutagênese. Um agrupamento de mutações que será introduzido em um cassete pode ser diferente ou o mesmo que um segundo agrupamento de mutações que será introduzido em um segundo cassete durante a aplicação de uma rodada de mutagênese por saturação. Tais agrupamentos são exemplificados por deleções, adições, agrupamentos de códons particulares e agrupamentos de cassetes de nucleotídeos particulares.

[00176] As sequências definidas que serão submetidas à mutagênese incluem um gene inteiro, uma via, um cDNA, um quadro aberto de leitura (ORF) inteiro e um promotor inteiro, um intensificador, um repressor/transativador, uma origem de replicação, um íntron, um operador ou qualquer grupo funcional de polinucleotídeo. Geralmente, "sequências definidas" para esta finalidade podem ser qualquer polinucleotídeo tal como uma sequência de polinucleotídeos de 15 bases e sequências de polinucleotídeos de comprimentos entre 15 bases e 15.000 bases (esta invenção cita especificamente cada número inteiro no intervalo). As considerações na escolha dos agrupamentos de códons incluem os tipos de aminoácidos codificados por um cassete mutagênico degenerado.

[00177] Em um exemplo de um agrupamento de mutações que pode ser introduzido em um cassete mutagênico, esta invenção fornece especificamente substituições de códons degenerados (utilizando oligos

degenerados) que codificam 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 e 20 aminoácidos em cada posição e uma biblioteca de polipeptídeos codificados pelos mesmos.

Remontagem por Ligação Sintética (SLR)

[00178] A invenção fornece um sistema de modificação gênica não-estocástica denominado "remontagem por ligação sintética" ou simplesmente "SLR", um "processo de evolução direcionada", para gerar polipeptídeos, por exemplo, enzimas fitases ou anticorpos da invenção, com propriedades novas ou alteradas. A SLR é um método de ligação de fragmentos de oligonucleotídeo de forma não-estocástica. Este método difere do embaralhamento de oligonucleotídeos estocástico no fato de que os blocos de construção de ácido nucleico não são embaralhados, concatenados ou quimerizados aleatoriamente, mas, ao invés disso, são montados de forma não-estocástica. Ver, por exemplo, as Patentes U.S. Nos 6.773.900; 6.740.506; 6.713.282; 6.635.449; 6.605.449; 6.537.776.

[00179] Em um aspecto, a SLR compreende as etapas a seguir: (a) fornecimento de um polinucleotídeo molde, em que o polinucleotídeo molde compreende uma sequência que codifica um gene homólogo; (b) fornecimento de um grande número de polinucleotídeos de blocos de construção, em que os polinucleotídeos de blocos de construção são planejados para sofrerem remontagem por "cross-over" com o polinucleotídeo molde em uma sequência predeterminada e um polinucleotídeo de bloco de construção compreende uma sequência que é uma variação do gene homólogo e uma sequência homóloga ao polinucleotídeo molde que flanqueia a sequência variante; (c) combinação do polinucleotídeo de bloco de construção com um polinucleotídeo molde de forma que o polinucleotídeo de bloco de construção sofre remontagem por

"cross-over" com o polinucleotídeo molde para gerar polinucleotídeos que compreendem variações da sequência do gene homólogo.

[00180] A SLR não depende da presença de altos níveis de homologia entre polinucleotídeos que serão rearranjados. Assim, este método pode ser utilizado para gerar bibliotecas (ou conjuntos) de forma não-estocástica de moléculas de progênie que compreendem mais de 10100 quimeras diferentes. A SLR pode ser utilizada para gerar bibliotecas que compreendem mais de 101000 quimeras de progênie diferentes. Assim, os aspectos da presente invenção incluem métodos de produção não-estocásticos de um conjunto de moléculas de ácidos nucleicos quiméricas finalizadas que possuem uma ordem de montagem geral que é escolhida por planejamento. Este método inclui as etapas de produção através de planejamento de um grande número de blocos de construção de ácidos nucleicos específicos que possuem extremidades que podem ser ligadas mutuamente compatíveis úteis e da montagem destes blocos de construção de ácidos nucleicos, de forma que uma ordem de montagem geral planejada é conseguida. As extremidades que podem ser ligadas mutuamente compatíveis dos blocos de construção de ácidos nucleicos que serão montados são consideradas como sendo "úteis" para este tipo de montagem ordenada se possibilitarem que os blocos de construção sejam acoplados em ordens predeterminadas. Assim, a ordem de montagem geral em que os blocos de construção de ácidos nucleicos podem ser acoplados é especificada pelo planejamento das extremidades que podem ser ligadas. Se mais de uma etapa de montagem tiver que ser utilizada, então a ordem de montagem geral em que os blocos de construção de ácidos nucleicos podem ser acoplados é também especificada pela ordem sequencial da(s) etapa(s) de montagem. Em um aspecto, as peças de construção aneladas são tratadas

com uma enzima, tal como uma ligase (por exemplo, T4 DNA ligase), para atingir a ligação covalente das peças de construção. Em um aspecto, um método não-estocástico denominado remontagem por ligação sintética (SLR), que é de alguma maneira relacionado ao embaralhamento estocástico, só que os blocos de construção de ácidos nucleicos não são embaralhados ou concatenados ou quimerizados aleatoriamente, mas, ao invés disso, são montados de forma não-estocástica, pode ser utilizado para criar variações.

[00181] O método de SLR não depende da presença de um alto nível de homologia entre os polinucleotídeos que serão embaralhados. A invenção pode ser utilizada para gerar bibliotecas (ou conjuntos) de forma não-estocástica de moléculas de progênie que compreendem mais de 10100 quimeras diferentes. De modo concebível, a SLR pode ainda ser utilizada para gerar bibliotecas que compreendem mais de 101000 quimeras de progênie diferentes.

[00182] Assim, em um aspecto, a invenção fornece um método de produção não-estocástica de um conjunto de moléculas de ácidos nucleicos quiméricas finalizadas que possuem uma ordem de montagem geral que é escolhida por planejamento, cujo método compreende as etapas de produção por planejamento de um grande número de blocos de construção de ácidos nucleicos específicos que possuem extremidades que podem ser ligadas mutuamente compatíveis úteis e de montagem destes blocos de construção de ácidos nucleicos, de forma que uma ordem de montagem geral planejada seja atingida.

[00183] As extremidades que podem ser ligadas mutuamente compatíveis dos blocos de construção de ácidos nucleicos que serão montados são consideradas como sendo "úteis" para este tipo de montagem

ordenada se possibilitarem que os blocos de construção sejam acoplados nas ordens predeterminadas. Assim, em um aspecto, a ordem de montagem geral em que os blocos de construção de ácidos nucleicos podem ser acoplados é especificada pelo planejamento das extremidades que podem ser ligadas e, se mais de uma etapa de montagem tiver que ser utilizada, então a ordem de montagem geral em que os blocos de construção de ácidos nucleicos podem ser acoplados é também especificada pela ordem sequencial da(s) etapa(s) de montagem. Em um aspecto da invenção, as peças de construção aneladas são tratadas com uma enzima, tal como uma ligase (por exemplo, T4 DNA ligase) para atingir a ligação covalente das peças de construção.

[00184] Em um outro aspecto, o planejamento dos blocos de construção de ácidos nucleicos é obtido após a análise das sequências de um conjunto de moldes de ácidos nucleicos progenitores que servem como uma base para a produção de um conjunto de progênie de moléculas de ácidos nucleicos quiméricas finalizadas. Estes moldes de ácidos nucleicos progenitores servem assim como uma fonte de informação de sequência que auxilia no planejamento dos blocos de construção de ácidos nucleicos que serão submetidos à mutagênese, isto é, quimerizados ou embaralhados.

[00185] Em um exemplo, a invenção fornece a quimerização de uma família de genes relacionados e sua família codificada de produtos relacionados. Em um exemplo particular, os produtos codificados são enzimas. As enzimas e os polipeptídeos para uso na invenção podem sofrer mutagênese de acordo com os métodos descritos aqui.

[00186] Assim, de acordo com um aspecto da invenção, as sequências de um grande número de moldes de ácidos nucleicos progenitores são alinhadas com a finalidade de selecionar um ou mais pontos de demarcação, cujos pontos de demarcação podem estar localizados em uma área de

homologia. Os pontos de demarcação podem ser utilizados para delinear os limites dos blocos de construção de ácidos nucleicos que serão gerados. Assim, os pontos de demarcação identificados e selecionados nas moléculas progenitoras servem como pontos de quimerização potenciais na montagem das moléculas progenitoras.

[00187] Tipicamente, um ponto de demarcação útil é uma área de homologia (compreendida de pelo menos uma base de nucleotídeo homóloga) compartilhada por pelo menos dois moldes progenitores, mas o ponto de demarcação pode ser uma área de homologia que é compartilhada por pelo menos a metade dos moldes progenitores, pelo menos dois terços dos moldes progenitores, pelo menos três quartos dos moldes progenitores ou quase todos os moldes progenitores. Em um aspecto, um ponto de demarcação útil é uma área de homologia que é compartilhada por todos os moldes progenitores.

[00188] Em um aspecto, o processo de remontagem por ligação é realizado exaustivamente com a finalidade de gerar uma biblioteca exaustiva. Em outras palavras, todas as combinações ordenadas possíveis dos blocos de construção de ácidos nucleicos são representadas no conjunto de moléculas de ácidos nucleicos quiméricas finalizadas. Ao mesmo tempo, a ordem de montagem (isto é, a ordem de montagem de cada bloco de construção na sequência 5' a 3' de cada ácido nucleico quimérico finalizado) em cada combinação é por planejamento (ou não-estocástica). Devido à natureza não-estocástica do método, a possibilidade de subprodutos indesejados é enormemente reduzida.

[00189] Em um outro aspecto, o método mostra que, o processo de remontagem por ligação é realizado de forma sistemática, por exemplo, com a finalidade de gerar uma biblioteca compartimentalizada de forma

sistemática, com compartimentos que podem ser verificados de forma sistemática, por exemplo, um por um. Em outras palavras, a invenção mostra que, através do uso seletivo e ponderado dos blocos de construção de ácidos nucleicos específicos, acoplado com o uso seletivo e ponderado de reações de montagem em etapas sequenciais, um planejamento experimental pode ser conseguido quando conjuntos específicos de produtos da progênie são obtidos em cada um de vários recipientes de reação. Isto permite que um exame sistemático e um procedimento de classificação sejam realizados. Assim, isto permite que um número potencialmente muito grande de moléculas da progênie seja examinado sistematicamente em grupos menores.

[00190] Devido a sua capacidade de realizar quimerizações de uma maneira que é altamente flexível e ainda exaustiva e também sistemática, particularmente quando há um baixo nível de homologia entre as moléculas progenitoras, a presente invenção fornece a produção de uma biblioteca (ou conjunto) compreendida de um grande número de moléculas da progênie. Devido à natureza não-estocástica da remontagem por ligação da presente invenção, as moléculas da progênie geradas podem compreender uma biblioteca de moléculas de ácidos nucleicos quiméricas finalizadas que possuem uma ordem de montagem geral que é escolhida por planejamento. Em um aspecto particular, tal biblioteca gerada é compreendida de mais de 10³ até mais de 10¹⁰⁰⁰ espécies moleculares diferentes da progênie.

[00191] Em um aspecto, um conjunto de moléculas de ácidos nucleicos quiméricas finalizadas, produzido como descrito, é compreendido de um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo. De acordo com um aspecto, este polinucleotídeo é um gene, que pode ser um gene produzido pelo ser humano. De acordo com um outro aspecto, este polinucleotídeo é

uma via gênica, que pode ser uma via gênica produzida pelo ser humano. A invenção mostra que um ou mais genes produzidos pelo ser humano gerados pela invenção podem ser incorporados em uma via gênica produzida pelo ser humano, tal como uma via que pode ser operacional em um organismo eucariótico (incluindo uma planta).

[00192] Em um outro exemplo, a natureza sintética da etapa em que os blocos de construção são gerados permite o planejamento e a introdução de nucleotídeos (por exemplo, um ou mais nucleotídeos, que podem ser, por exemplo, códons ou íntrons ou sequências reguladoras) que podem ser posteriormente opcionalmente removidos em um processo in vitro (por exemplo, por mutagênese) ou em um processo in vivo (por exemplo, através da utilização da capacidade de processamento do gene de um organismo hospedeiro). É considerado que em muitos casos a introdução destes nucleotídeos também pode ser desejável por muitas outras razões em adição ao benefício potencial de criar um ponto de demarcação útil.

[00193] Assim, de acordo com um outro aspecto, a invenção mostra que um bloco de construção de ácido nucleico pode ser utilizado para introduzir um íntron. Assim, a invenção mostra que íntrons funcionais podem ser introduzidos em um gene produzido pelo ser humano da invenção. A invenção mostra ainda que íntrons funcionais podem ser introduzidos em uma via gênica produzida pelo ser humano da invenção. Consequentemente, a invenção fornece a produção de um polinucleotídeo quimérico que é um gene produzido pelo ser humano que contém um (ou mais) íntron(s) introduzido(s) artificialmente.

[00194] Consequentemente, a invenção fornece ainda a produção de um polinucleotídeo quimérico que é uma via gênica produzida pelo ser humano que contém um (ou mais) íntron(s) introduzido(s) artificialmente.

Em um aspecto, o(s) íntron(s) introduzido(s) artificialmente é(são) funcional(is) em uma ou mais células hospedeiras para o processamento gênico muito da maneira em que os íntros que ocorrem naturalmente servem funcionalmente no processamento gênico. A invenção fornece um processo de produção de polinucleotídeos que contêm íntrons produzidos pelo ser humano que serão introduzidos nos organismos hospedeiros para recombinação e/ou processamento.

[00195] Um gene produzido pelo ser humano obtido utilizando a invenção também pode servir como um substrato para a recombinação com um outro ácido nucleico. Similarmente, uma via gênica produzida pelo ser humano obtida utilizando a invenção também pode servir como um substrato para a recombinação com um outro ácido nucleico. Em um aspecto, a recombinação é facilitada por ou ocorre em áreas de homologia entre o gene que contém íntrons produzidos pelo ser humano e um ácido nucleico que serve como um parceiro de recombinação. Em um aspecto, o parceiro de recombinação também pode ser um ácido nucleico gerado pela invenção, incluindo um gene produzido pelo ser humano ou uma via gênica produzida pelo ser humano. A recombinação pode ser facilitada por ou pode ocorrer em áreas de homologia que existem no um (ou mais) íntron(s) introduzido(s) artificialmente no gene produzido pelo ser humano.

[00196] O método de remontagem por ligação sintética da invenção utiliza um grande número de blocos de construção de ácidos nucleicos, dos quais cada um pode ter duas extremidades que podem ser ligadas. As duas extremidades que podem ser ligadas em cada bloco de construção de ácido nucleico podem ser duas pontas cegas (isto é, cada uma possuindo uma projeção de zero nucleotídeo) e uma ponta cega e uma ponta coesiva ou duas pontas coesivas.

[00197] Uma ponta coesiva útil para esta finalidade pode ser uma ponta coesiva 3' ou uma ponta coesiva 5'. Assim, um bloco de construção de ácido nucleico pode ter uma ponta coesiva 3' ou alternativamente uma ponta coesiva 5' ou alternativamente duas pontas coesivas 3' ou alternativamente duas pontas coesivas 5'. A ordem geral em que os blocos de construção de ácidos nucleicos são montados para formar uma molécula de ácido nucleico quimérica finalizada é determinada através de planejamento experimental propositado e não é aleatória.

[00198] Em um aspecto, um bloco de construção de ácido nucleico é gerado através da síntese química de dois ácidos nucleicos de fita simples (também referidos como oligos de fita simples) e do contato destes de forma a permitir que estes se anelem para formar um bloco de construção de ácido nucleico de fita dupla.

[00199] Um bloco de construção de ácido nucleico de fita dupla pode ser de tamanho variável. Os tamanhos destes blocos de construção podem ser pequenos ou grandes. Os exemplos de tamanhos para o bloco de construção variam de 1 par de bases (não incluindo quaisquer projeções (pontas coesivas)) até 100.000 pares de bases (não incluindo quaisquer projeções (pontas coesivas)). São também fornecidas outras faixas de tamanhos, que possuem limites inferiores de 1 pb até 10.000 pb (incluindo cada valor de número inteiro intermediário) e limites superiores de 2 pb até 100.000 pb (incluindo cada valor de número inteiro intermediário).

[00200] Há muitos métodos através dos quais pode ser gerado um bloco de construção de ácido nucleico de fita dupla que é útil para a invenção; e estes são conhecidos na técnica e podem ser facilmente realizados pelo versado na técnica.

[00201] De acordo com um aspecto, um bloco de construção de ácido

nucleico de fita dupla é gerado produzindo primeiro dois ácidos nucleicos de fita simples e permitindo que estes se anelem para formar um bloco de construção de ácido nucleico de fita dupla. As duas fitas de um bloco de construção de ácido nucleico de fita dupla podem ser complementares em cada nucleotídeo não considerando qualquer um que forma uma ponta coesiva; não contendo assim pareamentos errados, não considerando qualquer(qualsquer) ponta(s) coesiva(s). De acordo com um outro aspecto, as duas fitas de um bloco de construção de ácido nucleico de fita dupla são complementares em menos do que cada nucleotídeo não considerando qualquer um que forma uma ponta coesiva. Assim, de acordo com este aspecto, um bloco de construção de ácido nucleico de fita dupla pode ser utilizado para introduzir degeneração de códons. Em um aspecto, a degeneração de códons é introduzida utilizando a mutagênese por saturação no sítio descrita aqui, utilizando um ou mais cassetes N,N,G/T ou alternativamente utilizando um ou mais cassetes N,N,N.

[00202] O método de recombinação in vivo da invenção pode ser realizado de forma cega em um grupo de híbridos ou alelos desconhecidos de um polinucleotídeo ou uma sequência específica. Entretanto, não é necessário conhecer a sequência de DNA ou de RNA real do polinucleotídeo específico.

[00203] A abordagem de utilização de recombinação dentro de uma população mista de genes pode ser útil para a produção de quaisquer proteínas úteis, por exemplo, interleucina I, anticorpos, tPA e hormônio do crescimento. Esta abordagem pode ser utilizada para gerar proteínas que possuem especificidade ou atividade alterada. A abordagem também pode ser útil para a produção de sequências de ácidos nucleicos híbridos, por exemplo, regiões promotoras, íntrons, éxons, sequências intensificadoras,

regiões não-traduzidas 3' ou regiões não-traduzidas 5' dos genes. Assim, esta abordagem pode ser utilizada para gerar genes que possuem maiores taxas de expressão. Esta abordagem também pode ser útil no estudo de sequências de DNA repetitivas. Finalmente, esta abordagem pode ser útil para mutar ribozimas ou aptâmeros.

[00204] Em um aspecto, as variações dos polinucleotídeos e dos polipeptídeos descritos aqui são obtidas através do uso de ciclos repetidos de reagrupamento redutivo, recombinação e seleção que permitem a evolução molecular direcionada de sequências lineares altamente complexas, tal como DNA, RNA ou proteínas ao longo da recombinação.

[00205] O embaralhamento *in vivo* de moléculas é útil no fornecimento de variações e pode ser realizado utilizando a propriedade natural das células de recombinar multímeros. Embora a recombinação *in vivo* tenha fornecido a rota natural principal para a diversidade molecular, a recombinação genética continua sendo um processo relativamente complexo que envolve 1) o reconhecimento de homologias; 2) clivagem dos fitas, invasão dos fitas e etapas metabólicas que levam à produção do quiasma recombinante; e finalmente 3) a resolução do quiasma em moléculas recombinantes distintas. A formação do quiasma requer o reconhecimento de sequências homólogas.

[00206] Em um outro aspecto, a invenção inclui um método para a produção de um polinucleotídeo híbrido de pelo menos um primeiro polinucleotídeo e um segundo polinucleotídeo. A invenção pode ser utilizada para produzir um polinucleotídeo híbrido através da introdução de pelo menos um primeiro polinucleotídeo e um segundo polinucleotídeo que compartilham pelo menos uma região de homologia de sequência parcial (por exemplo, SEQ ID NO: 1) em uma célula hospedeira adequada. As

regiões de homologia de sequência parcial promovem processos que resultam na reorganização da sequência produzindo um polinucleotídeo híbrido. O termo "polinucleotídeo híbrido", como utilizado aqui, é qualquer sequência de nucleotídeos que resulta do método da presente invenção e contém a sequência de pelo menos duas sequências de polinucleotídeos originais. Tais polinucleotídeos híbridos podem resultar de eventos de recombinação intermoleculares que promovem a integração de sequências entre moléculas de DNA. Em adição, tais polinucleotídeos híbridos podem resultar dos processos de reagrupamento redutivo intramoleculares que utilizam sequências repetidas para alterar uma sequência de nucleotídeos dentro de uma molécula de DNA.

[00207] A invenção fornece métodos para gerar polinucleotídeos híbridos que podem codificar polipeptídeos híbridos biologicamente ativos (por exemplo, uma fitase híbrida). Em um aspecto, os polinucleotídeos originais codificam polipeptídeos biologicamente ativos. O método da invenção produz novos polipeptídeos híbridos através da utilização de processos celulares que integram a sequência dos polinucleotídeos originais de forma que o polinucleotídeo híbrido resultante codifica um polipeptídeo que demonstra atividades derivadas dos polipeptídeos biologicamente ativos originais. Por exemplo, os polinucleotídeos originais podem codificar uma enzima particular de micro-organismos diferentes. Uma enzima codificada por um primeiro polinucleotídeo de um organismo ou variação pode, por exemplo, funcionar eficientemente sob uma condição ambiental particular, por exemplo, salinidade alta. Uma enzima codificada por um segundo polinucleotídeo de um organismo diferente ou variação pode funcionar eficientemente sob uma condição ambiental diferente, tal como temperaturas extremamente altas. Um polinucleotídeo híbrido que contém sequências do

primeiro e do segundo polinucleotídeos originais pode codificar uma enzima que exibe características de ambas as enzimas codificadas pelos polinucleotídeos originais. Assim, a enzima codificada pelo polinucleotídeo híbrido pode funcionar eficientemente sob condições ambientais compartilhadas por cada uma das enzimas codificadas pelo primeiro e pelo segundo polinucleotídeos, por exemplo, salinidade alta e temperaturas extremas.

[00208] Em adição aos vários métodos descritos anteriormente, são conhecidos na técnica vários métodos que podem ser utilizados para a obtenção de polinucleotídeos híbridos com propriedades enzimáticas melhoradas. Os exemplos a seguir ilustram o uso de tais procedimentos para a obtenção de enzimas termoestáveis ou termotolerantes através da mutagênese de um polinucleotídeo que codifica uma enzima do tipo selvagem de interesse.

[00209] Por exemplo, em um aspecto, a invenção utiliza métodos que são descritos por M. Lehmann e outros (em *Biochimica et Biophysica Acta* 1543:408-415, 2000), que descrevem uma "abordagem consenso" em que o alinhamento de sequências de fitases fúngicas homólogas era utilizado para calcular uma sequência de aminoácidos de fitase consenso. Após a construção do gene consenso correspondente, a expressão recombinante e a purificação, a fitase recombinante obtida exibiu uma temperatura de desdobramento (T_m) 15-22° C maior que a das fitases originais utilizadas no planejamento. A mutagênese direcionada ao sítio do gene que codifica a proteína recombinante foi utilizada para aumentar adicionalmente o valor de T_m para 90,4° C. O efeito de termoestabilização foi atribuído a uma combinação de várias alterações de aminoácidos que foram distribuídas ao longo da sequência inteira da proteína e afetou principalmente os resíduos

expostos na superfície.

[00210] Em um aspecto, a invenção utiliza métodos para a obtenção de uma enzima com propriedades térmicas melhoradas como descrito por L. Jermutus e outros (J. of Biotechnology 85:15-24, 2001). Nesta abordagem interações iônicas e pontes de hidrogênio na superfície da fitase de *Aspergillus terreus* foram primeiramente restauradas para corresponderem àquelas presentes no homólogo, mas uma enzima mais termoestável de *A. niger*. Então, os elementos estruturais secundários inteiros foram substituídos na mesma região e se baseavam na estrutura de cristal da fitase de *A. niger*. A substituição de uma α -hélice na superfície da fitase de *A. terreus* pelo filamento correspondente da fitase de *A. niger* resultou em uma enzima quimérica baseada na estrutura (proteína de fusão) com maior termoestabilidade e atividade enzimática inalterada.

[00211] Em um aspecto, a invenção utiliza métodos que são descritos por L. Giver e outros (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:12809-12813, 1998), que descrevem um procedimento em que seis gerações de mutagênese aleatória introduzidas durante a PCR mutagênica de um polinucleotídeo que codifica p-nitrobenzil esterase de *Bacillus subtilis* seguida pela recombinação in vitro baseada no método de Stemmer resultaram em uma esterase recombinante com maior termoestabilidade (aumento maior que 14°C na T_m) sem comprometer a atividade catalítica a temperaturas mais baixas.

[00212] Em um aspecto, a invenção utiliza métodos que são descritos por C. Vetriani e outros (Proc. Natl. Acad. Sci USA 95:12300-12305, 1998), que descrevem um procedimento através do qual a modelagem baseada na homologia e a comparação direta das estruturas das glutamato desidrogenases hexaméricas dos hipertermófilos *Pyrococcus furiosus* e

Thermococcus litoralis, com temperaturas de crescimento ótimas de 100 °C e 88 °C, respectivamente, foram utilizadas para determinar características de termoestabilização chave. Uma rede de pares iônicos intersubunidades observada como sendo substancialmente reduzida na enzima menos estável foi alterada através da mutagênese de dois resíduos contidos na mesma para restaurar as interações observadas na enzima mais estável. Embora qualquer mutação isolada tivesse efeitos adversos sobre a termoestabilidade, com ambas as mutações no local, foi observado um aumento de quatro vezes na estabilidade a 104° C em relação à enzima do tipo selvagem.

[00213] Em um aspecto, a invenção utiliza métodos que são descritos por A. Tomschy e outros (Protein Science 9:1304-1311, 2000), que descrevem um procedimento que utiliza a estrutura de cristal da fitase de *Aspergillus niger* (em uma resolução de 2,5 angstroms) para especificar todos os sítios ativos da enzima. Um alinhamento múltiplo de sequências de aminoácidos foi então utilizado para identificar resíduos de sítios ativos não-conservados que poderiam se correlacionar com uma certa propriedade favorável de interesse. Utilizando esta abordagem, Gln27 da fitase de *A. fumigatus*, que diferia de Leu27 de *A. Niger*, foi identificado como estando provavelmente envolvido na ligação e/ou na liberação do substrato e responsável pela atividade específica baixa da fitase de *A. fumigatus* (26,5 vs. 196,6 U/mg de proteína em pH 5,0). A mutagênese direcionada ao sítio de Gln27 da fitase de *A. fumigatus* para Leu aumentou a atividade específica da enzima mutante para 92,1 U/mg de proteína.

Plantas e Sementes Transgênicas

[00214] A invenção fornece plantas e sementes transgênicas que compreendem um ácido nucleico, um polipeptídeo, um cassete de expressão, um mecanismo de clonagem ou um vetor da invenção ou uma célula

transfectada ou transformada da invenção. A invenção fornece ainda produtos vegetais, por exemplo, óleos, sementes, folhas, extratos e similares, que compreendem um ácido nucleico e/ou um polipeptídeo da invenção. A planta transgênica pode ser dicotiledônea (uma dicot) ou monocotiledônea (uma monocot). A invenção fornece ainda métodos de produção e de utilização destas plantas e sementes transgênicas. A planta transgênica ou a célula vegetal que expressa um polipeptídeo da presente invenção pode ser construída de acordo com qualquer método conhecido na técnica. Ver, por exemplo, a Patente U.S. Nº 6.309.872.

[00215] A expressão ou a superexpressão recombinante, das moléculas de fitase da invenção pode ser conseguida em combinação com uma ou mais moléculas adicionais tais como, por exemplo, outras enzimas. Esta abordagem é útil para a obtenção de produtos de combinação, tal como uma planta ou uma parte da planta que contém as presentes moléculas de fitase assim como uma ou mais moléculas adicionais. As moléculas de fitase desta invenção e as moléculas adicionais podem ser utilizadas em um tratamento de combinação. As moléculas expressas de forma recombinante resultantes podem ser utilizadas na forma homogeneizada e/ou purificada ou alternativamente na forma relativamente não-purificada (por exemplo, na forma de partes da planta que podem ser consumidas que são úteis quando misturadas com outras matérias alimentícias para catalisar a degradação do fitato).

[00216] Em um aspecto particular, a presente invenção fornece a expressão da fitase em plantas ou órgãos vegetais transgênicos e métodos para a produção dos mesmos. Os constructos de expressão de DNA são fornecidos para a transformação de plantas com um gene que codifica a fitase sob o controle de sequências reguladoras que são capazes de

direcionar a expressão da fitase. Estas sequências reguladoras incluem sequências capazes de direcionar a transcrição nas plantas, de forma constitutiva ou de maneiras específicas ao estágio e/ou ao tecido.

[00217] A forma de expressão depende, em parte, do uso da planta ou de partes da mesma. As plantas e os órgãos vegetais transgênicos fornecidos pela presente invenção podem ser aplicados a uma variedade de processos industriais diretamente, por exemplo, em produtos alimentícios para animais ou alternativamente, a fitase expressa pode ser extraída e, se desejado, purificada antes da aplicação. Alternativamente, a planta hospedeira ou a parte da planta recombinante pode ser utilizada diretamente. Em um aspecto particular, a presente invenção fornece métodos de catálise de reações de hidrólise de fitato utilizando sementes contendo maiores quantidades de fitase. O método envolve colocar em contato sementes sem ser do tipo selvagem transgênicas, por exemplo, em uma forma triturada ou mastigada, com substrato contendo fitato e permitir que as enzimas nas sementes aumentem a taxa de reação. Através da adição direta das sementes a um substrato que contém fitato, a invenção fornece uma solução para o processo caro e problemático de extração e purificação da enzima. Em um exemplo, a presente invenção fornece métodos de tratamento através dos quais um organismo que não possui um suprimento suficiente de uma enzima recebe a administração da enzima na forma de sementes contendo maiores quantidades da enzima. Em um aspecto, o momento da administração da enzima a um organismo é coordenado com o consumo de uma matéria alimentícia que contém fitato.

[00218] A expressão da fitase em plantas pode ser conseguida através de uma variedade de meios. Especificamente, por exemplo, estão disponíveis tecnologias para a transformação de um grande número de

espécies vegetais, incluindo espécies de dicotiledôneas (por exemplo, tabaco, batata, tomate, Petunia, Brassica) e espécies de monocotiledôneas. Adicionalmente, por exemplo, estão disponíveis estratégias para a expressão de genes estranhos em plantas. Ainda adicionalmente, foram identificadas sequências reguladoras de genes de plantas que são úteis para a construção de genes quiméricos que podem ser funcionalmente expressos em plantas e em células vegetais (por exemplo, Klee (1987) *Ann. Rev. of Plant Phys.* 38:467-486; Clark e outros (1990) *Virology* Dec; 179(2):640-7; Smith e outros (1990) *Mol. Gen. Genet.* Dec; 224(3):477-81.

[00219] A introdução de constructos gênicos em plantas pode ser conseguida utilizando várias tecnologias incluindo a transformação com *Agrobacterium tumefaciens* ou com *Agrobacterium rhizogenes*. Os exemplos não-limitantes de tecidos vegetais que podem ser transformados de tal maneira incluem protoplastos, microsporos ou pólen e explantes tais como folhas, caules, raízes, hipocotilédones e cotilédones. Além disso, o DNA pode ser introduzido diretamente em protoplastos e células ou tecidos vegetais através de microinjeção, eletroporação, bombardeio de partículas e captação direta de DNA.

[00220] As proteínas podem ser produzidas nas plantas através de uma variedade de sistemas de expressão. Por exemplo, o uso de um promotor constitutivo tal como o promotor 35S do Vírus Mosaico da Couve-flor (Guilley e outros, 1982) é útil para o acúmulo da proteína expressa em virtualmente todos os órgãos da planta transgênica. Alternativamente, o uso de promotores que são altamente específicos ao tecido e/ou específicos ao estágio é útil para esta invenção (Higgins, 1984; Shotwell, 1989) com a finalidade de induzir a expressão em direção a tecidos desejados e/ou em direção a um estágio de desenvolvimento desejado. A invenção também

utiliza protocolos para a expressão em plantas das moléculas de fitase da presente invenção como divulgado, por exemplo, na Patente U.S. Nº 5.770.413 (Van Ooijen e outros) e na Patente U.S. Nº 5.593.963 (Van Ooijen e outros), que ensina o uso de fitases fúngicas.

Modificação de Sequências Codificadoras e Sequências Adjacentes

[00221] A expressão transgênica em plantas de genes derivados de fontes heterólogas pode envolver a modificação de tais genes para atingir e otimizar sua expressão em plantas. Em particular, ORFs bacterianos que codificam enzimas separadas, mas que são codificados pelo mesmo produto de transcrição no micro-organismo nativo são expressos da melhor maneira em plantas em produtos de transcrição separados. Assim, em um aspecto, para conseguir isto, cada ORF microbiano é isolado individualmente e clonado dentro de um cassete que fornece uma sequência promotora de planta na extremidade 5' do ORF e um terminador da transcrição de planta na extremidade 3' do ORF. A sequência do ORF isolado pode incluir o códon de início ATG e o códon de término STOP, mas pode incluir sequência adicional além do códon de início ATG e do STOP. Em adição, o ORF pode estar truncado, mas ainda manter a atividade requerida; para ORFs particularmente longos, versões truncadas que mantêm a atividade podem ser preferidas para a expressão nos organismos transgênicos. "Promotores de plantas" e "terminadores da transcrição de plantas" que podem ser utilizados para a prática desta invenção incluem quaisquer promotores e/ou terminadores da transcrição que operam dentro das células vegetais. Isto inclui promotores e terminadores da transcrição que podem ser derivados de fontes não-vegetais tais como vírus (um exemplo é o Vírus Mosaico da Couve-flor).

[00222] Em alguns casos, a modificação nas sequências codificadoras

dos ORFs e na sequência adjacente não é necessária. É suficiente isolar um fragmento que contém o ORF de interesse e inseri-lo a jusante de um promotor de planta. Por exemplo, Gaffney e outros (Science 261: 754-756 (1993)) expressaram o gene nahG de Pseudomonas em plantas transgênicas sob o controle do promotor 35S do CaMV e o terminador tml do CaMV de forma bem-sucedida sem a modificação da sequência codificadora e com nucleotídeos do gene de Pseudomonas a montante do ATG ainda ligados e nucleotídeos a jusante do códon STOP ainda ligados ao ORF de nahG. Preferencialmente apenas a sequência microbiana adjacente deve ser deixada ligada a montante do ATG e a jusante do códon STOP. Na prática, tal construção pode depender da disponibilidade de sítios de restrição.

[00223] Em outros casos, a expressão de genes derivados de fontes microbianas pode fornecer problemas na expressão. Estes problemas foram bem caracterizados na técnica e são particularmente comuns com genes derivados de certas fontes microbianas. Estes problemas podem se aplicar à sequência de nucleotídeos desta invenção e a modificação destes genes pode ser realizada utilizando técnicas agora bem conhecidas na técnica. Podem ser encontrados os problemas a seguir:

Uso de Códon

[00224] A invenção fornece ácidos nucleicos que possuem códon modificados para uso em plantas; em alguns casos o uso de códon preferidos em plantas difere do uso de códon preferidos em certos micro-organismos. A comparação do uso de códon dentro de um ORF microbiano clonado ao uso em genes de plantas (e, em particular, genes da planta alvo) possibilitará uma identificação dos códon dentro do ORF que devem ser preferencialmente alterados. Tipicamente a evolução das plantas tendeu em direção a uma forte preferência dos nucleotídeos C e G na posição da

terceira base de monocotiledôneas, enquanto que as dicotiledôneas utilizam frequentemente os nucleotídeos A ou T nesta posição. Através da modificação de um gene para incorporar o uso de códons preferidos para uma espécie transgênica alvo particular, muitos dos problemas descritos abaixo para o teor de GC/AT e para o processamento ilegítimo serão resolvidos.

Teor de GC/AT

[00225] A invenção fornece ácidos nucleicos que possuem seu teor de GC modificado, por exemplo, para uso em plantas; os genes de plantas possuem tipicamente um teor de GC de mais de 35%. As sequências do ORF que são ricas em nucleotídeos A e T podem causar vários problemas nas plantas. Em primeiro lugar, acredita-se que motivos de ATTTA causam a desestabilização de mensagens e são observados na extremidade 3' de muitos mRNAs de vida curta. Em segundo lugar, acredita-se que a ocorrência de sinais de poliadenilação tal como AATAAA em posições inapropriadas dentro da mensagem causa a interrupção prematura da transcrição. Em adição, as monocotiledôneas podem reconhecer sequências ricas em AT como sítios de combinação (ver abaixo).

Sequências Adjacentes à Metionina de Início

[00226] A invenção fornece ácidos nucleicos que possuem nucleotídeos adjacentes ao ATG modificado e/ou adicionado; as plantas diferem dos micro-organismos no fato de que suas mensagens não possuem um sítio de ligação ao ribossomo. Ao invés disso, acredita-se que os ribossomos se ligam à extremidade 5' da mensagem e buscam o primeiro ATG disponível no qual iniciam a tradução. No entanto, acredita-se que há uma preferência por certos nucleotídeos adjacentes ao ATG e que a expressão de genes microbianos pode ser aumentada pela inclusão de um

iniciador da tradução consenso eucariótico no ATG. A Clontech (catálogo de 1993/1994, página 210, incorporado aqui como referência) sugeriu uma sequência como um iniciador da tradução consenso para a expressão do gene uidA de E. coli em plantas. Ainda, Joshi (N.A.R. 15: 6643-6653 (1987), incorporado aqui como referência) comparou muitas sequências de plantas adjacentes ao ATG e sugere uma outra sequência consenso. Em situações em que são encontradas dificuldades na expressão de ORFs microbianos em plantas, a inclusão de uma destas sequências no ATG de início pode aumentar a tradução. Em tais casos, os últimos três nucleotídeos do consenso podem não ser apropriados para a inclusão na sequência modificada devido a sua modificação do segundo resíduo de AA. Em alguns aspectos, as sequências preferidas adjacentes à metionina de início podem diferir entre espécies de plantas diferentes. Uma análise de 14 genes de milho localizados no banco de dados do GenBank forneceu os resultados a seguir:

Posição Antes do ATG de Início em 14 Genes de Milho:

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

[00227] Esta análise pode ser feita para a espécie de planta desejada na qual a sequência de nucleotídeos está sendo incorporada e para a sequência adjacente ao ATG modificado para incorporar os nucleotídeos preferidos.

Remoção de Sítios de Combinação Ilegítimos

[00228] A invenção fornece ácidos nucleicos que possuem sítios de combinação ilegítimos modificados ou removidos ou funcionalmente "knocked out"; os genes clonados partindo de fontes sem ser vegetais e não otimizados para expressão em plantas também podem conter motivos que

podem ser reconhecidos em plantas na forma de sítios de combinação 5' ou a 3' e ser clivados, gerando assim mensagens truncadas ou deletadas. Estes sítios podem ser removidos utilizando as técnicas bem conhecidas no assunto.

[00229] As técnicas para a modificação de sequências codificadoras e de sequências adjacentes são bem conhecidas no assunto. Nos casos em que a expressão inicial de um ORF microbiano é baixa e este é considerado apropriado para fazer alterações na sequência como descrito anteriormente, então a construção de genes sintéticos pode ser realizada de acordo com os métodos bem conhecidos na técnica. Estes são, por exemplo, descritos nas divulgações de patentes publicadas EP 0 385 962 (a Monsanto), EP 0 359 472 (a Lubrizol) e WO 93/07278 (a Ciba-Geigy), das quais todas são incorporadas aqui como referência. Na maioria dos casos é preferível analisar a expressão de construções gênicas utilizando protocolos de ensaios transitórios (que são bem conhecidos na técnica) antes de sua transferência para as plantas transgênicas.

Promotores de Plantas

[00230] As composições da invenção podem conter sequências de ácidos nucleicos, por exemplo, promotores, por exemplo, para a transformação e para a expressão em uma planta de interesse. As sequências de ácidos nucleicos podem estar presentes em constructos de DNA ou cassetes de expressão. Os ácidos nucleicos da invenção podem ser ou compreender, "cassetes de expressão", incluindo qualquer molécula de ácido nucleico capaz de direcionar a expressão de uma sequência de nucleotídeos particular em uma célula hospedeira apropriada que compreende um promotor ligado de forma operacional à sequência de nucleotídeos de interesse que está ligada de forma operacional aos sinais de término.

[00231] As composições (por exemplo, sequências de ácidos nucleicos) da invenção também podem compreender sequências necessárias para a tradução apropriada da sequência de nucleotídeos. A região codificadora codifica geralmente uma proteína de interesse, mas também pode codificar um RNA funcional de interesse, por exemplo, RNA antissenso ou um RNA não-traduzido, na direção senso ou antissenso. O cassete de expressão que compreende a sequência de nucleotídeos de interesse pode ser quimérico, significando que pelo menos um de seus componentes é heterólogo em relação a pelo menos um de seus outros componentes. O cassete de expressão também pode ser um que ocorre naturalmente, mas que foi obtido em uma forma recombinante útil para expressão heteróloga. Tipicamente, entretanto, o cassete de expressão é heterólogo em relação ao hospedeiro, isto é, a sequência de DNA particular do cassete de expressão não ocorre naturalmente na célula hospedeira e tem que ter sido introduzida na célula hospedeira ou em um ancestral da célula hospedeira através de um evento de transformação. A expressão da sequência de nucleotídeos no cassete de expressão pode estar sob o controle de um promotor constitutivo ou de um promotor que pode ser induzido que inicia a transcrição apenas quando a célula hospedeira é exposta a algum estímulo externo particular. Adicionalmente, o promotor também pode ser específico a um tecido ou órgão ou estágio de desenvolvimento particular.

[00232] A presente invenção abrange a transformação de plantas com cassetes de expressão capazes de expressar polinucleotídeos. O cassete de expressão incluirá na direção 5'-3' da transcrição, uma região de início da transcrição e da tradução (isto é, um promotor) e um polinucleotídeo de interesse. O cassete de expressão pode compreender opcionalmente uma região de término da transcrição e da tradução (isto é, uma região de

término) funcional em plantas. Em algumas modalidades, o cassete de expressão compreende um gene marcador que pode ser selecionado para permitir a seleção de transformantes estáveis. Os constructos de expressão da invenção também podem compreender uma sequência-líder e/ou uma sequência que permite a expressão que pode ser induzida do polinucleotídeo de interesse. Ver, Guo e outros (2003) Plant J. 34:383-92 e Chen e outros (2003) Plant J. 36:731-40 para exemplos de sequências que permitem a expressão que pode ser induzida.

[00233] As sequências reguladoras do constructo de expressão estão ligadas de forma operacional ao polinucleotídeo de interesse. "Ligado de forma operacional" significa uma ligação funcional entre um promotor e uma segunda sequência em que a sequência promotora inicia e medeia a transcrição da sequência de DNA que corresponde à segunda sequência. Geralmente, ligado de forma operacional significa que as sequências de nucleotídeos que estão sendo ligadas são contíguas.

[00234] Qualquer promotor capaz de controlar a expressão na planta de interesse pode ser utilizado na prática da invenção. O promotor pode ser nativo ou análogo ou estranho ou heterólogo ao hospedeiro vegetal. Os termos "heteróloga" e "exógena" quando utilizados aqui para se referir a uma sequência de ácido nucleico (por exemplo, uma sequência de DNA ou de RNA) ou um gene, referem-se a uma sequência que se origina de uma fonte estranha à célula hospedeira particular ou, se for da mesma fonte, é modificada de sua forma original. Assim, um gene heterólogo em uma célula hospedeira inclui um gene que é endógeno à célula hospedeira particular, mas foi modificado. Os termos também incluem várias cópias que não ocorrem naturalmente de uma sequência de DNA que ocorre naturalmente. Assim, os termos se referem a um segmento de DNA que é estranho ou

heterólogo à célula ou homólogo à célula, mas em uma posição dentro do ácido nucleico da célula hospedeira em que o elemento não é comumente encontrado. Segmentos de DNA exógenos são expressos para produzir polipeptídeos exógenos. Em modalidades alternativas, uma sequência de ácido nucleico "homóloga" (por exemplo, DNA) é uma sequência de ácido nucleico (por exemplo, DNA ou RNA) associada naturalmente a uma célula hospedeira na qual é introduzida.

[00235] A escolha de promotores que serão incluídos depende de vários fatores, incluindo, mas não-limitados à eficiência, à capacidade de seleção, à capacidade de indução, ao nível de expressão desejado e à expressão preferencial à célula ou ao tecido. É um assunto de rotina para um versado na técnica modular a expressão de uma sequência através da seleção e do posicionamento apropriados de promotores e outras regiões reguladoras em relação a tal sequência.

[00236] Alguns promotores adequados iniciam a transcrição somente ou predominantemente, em certos tipos de células. Assim, como utilizado aqui um promotor preferencial ao tipo celular ou ao tecido é um que controla a expressão preferencialmente no tecido-alvo, mas também pode levar a alguma expressão em outros tipos de células ou tecidos. Os métodos para a identificação e para a caracterização de regiões promotoras no DNA genômico de plantas incluem, por exemplo, os descritos nas referências a seguir: Jordano e outros, *Plant Cell*, 1:855-866 (1989); Bustos e outros, *Plant Cell*, 1:839-854 (1989); Green e outros, *EMBO J.* 7, 4035-4044 (1988); Meier e outros, *Plant Cell*, 3, 309-316 (1991); e Zhang e outros, *Plant Physiology* 110: 1069-1079 (1996).

[00237] Vários genes e/ou promotores preferidos regulados no tecido foram relatados em plantas. Alguns genes preferidos para os tecidos

relatados incluem os genes que codificam as proteínas de armazenamento das sementes (tais como napina, cruciferina, beta-conglicinina e faseolina, prolaminas, glutelinas, globulinas e zeínas), zeínas ou proteínas de corpo oleoso (tal como oleosina) ou genes envolvidos na biossíntese de ácidos graxos (incluindo a proteína carreadora de acila, estearoil-ACP dessaturase e ácido graxo dessaturases (fad 2-1)) e outros genes expressos durante o desenvolvimento embrionário (tal como Bce4, ver, por exemplo, EP 255378 e Kridl e outros, (1991) *Seed Science Research*, 1:209).

[00238] Os exemplos de promotores específicos ao tecido, que foram descritos, incluem a lectina (Vodkin, *Prog. Clin. Biol. Res.*, 138:87 (1983); Lindstrom e outros, (1990) *Dev. Genet.*, 11:160), álcool desidrogenase 1 do milho (Dennis e outros, *Nucleic Acids Res.*, 12:3983 (1984)), complexo de captação de luz do milho (ver, por exemplo, Simpson, (1986) *Science*, 233:34; Bansal (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3654), proteína de choque térmico do milho (ver, por exemplo, Odell e outros, (1985) *Nature*, 313:810; subunidade pequena da RuBP carboxilase da ervilha (ver, por exemplo, Poulsen e outros, (1986) *Mol. Gen. Genet.*, 205:193-200; Cashmore e outros, (1983) *Gen. Eng. of Plants*, Plenum Press, Nova York, 29-38); manopina sintase do plasmídeo Ti (ver, por exemplo, Langridge e outros, (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:3219-3223), nopalina sintase do plasmídeo Ti (Langridge e outros, (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:3219-3223), chalcona isomerase da petúnia (ver, por exemplo, vanTunen (1988) *EMBO J.* 7:1257); proteína 1 rica em glicina do feijão (ver, por exemplo,

Keller (1989) *Genes Dev.* 3:1639); 35S do CaMV truncado (ver, por exemplo, Odell (1985) *Nature* 313:810); patatina da batata (ver, por exemplo, Wenzler (1989) *Plant Mol. Biol.* 13:347; célula de raiz (ver, por exemplo, Yamamoto (1990) *Nucleic Acids Res.* 18:7449); zeína do milho (ver, por exemplo, Reina (1990) *Nucleic Acids Res.* 18:6425; Lopes e outros (1995) *Mol. Gen. Genet.* 247: 603-613; Kriz (1987) *Mol. Gen. Genet.* 207:90; Wandelt (1989) *Nucleic Acids Res.*, 17:2354; Langridge (1983) *Cell*, 34:1015; Reina (1990) *Nucleic Acids Res.*, 18:7449), promotor ADP-gpp (ver, por exemplo, Patente U.S. No 7.102.057); globulina-1 (ver, por exemplo, Belanger (1991) *Genetics* 129:863); α -globulina (Sunilkumar, e outros (2002), *Transgenic Res.* 11:347-359); α -tubulina; cab (ver, por exemplo, Sullivan (1989) *Mol. Gen. Genet.*, 215:431); PEPCase (ver, por exemplo, Hudspeth & Grula, (1989) *Plant Molec. Biol.*, 12:579-589); promotores associados ao complexo do gene R (Chandler e outros, (1989) *Plant Cell*, 1:1175); promotor da vicilina da ervilha (Czako e outros, (1992) *Mol. Gen. Genet.*, 235:33; Patente U.S. No 5.625.136); promotor GTL1 (Takaiwa e outros (1991) *Plant Mol. Biol.* 16 (1), 49-58); promotores da chalcona sintase (Franken e outros, (1991) *EMBO J.*, 10:2605); promotor GY1 (Sims & Goldberg (1989) *Nuc. Acid Res.* 17(11) 4368) e similares; dos quais todos são incorporados aqui como referência.

[00239] A invenção pode utilizar promotores preferidos para os frutos, incluindo qualquer classe de promotores preferidos para os frutos, por exemplo, que são expressos na ou durante a antítese ao longo do

desenvolvimento dos frutos, pelo menos até o início do amadurecimento, por exemplo, como discutido na U.S. 4.943.674, cuja divulgação é incorporada aqui como referência. O promotor para o gene da poligalacturonase é ativo no amadurecimento dos frutos. A invenção pode utilizar o gene da poligalacturonase como descrito, por exemplo, na Patente U.S. Nº 4.535.060, na Patente U.S. Nº 4.769.061, na Patente U.S. Nº 4.801.590 e na Patente U.S. Nº 5.107.065, cujas divulgações são incorporadas aqui como referência.

[00240] A invenção pode utilizar quaisquer promotores preferidos para os tecidos, incluindo aqueles que direcionam a expressão nas células da folha após danos na folha (por exemplo, causados por insetos mastigadores), nos tubérculos (por exemplo, promotor do gene da patatina) e nas células de fibra (um exemplo de uma proteína de célula de fibra regulada pelo desenvolvimento é E6 (John & Crow (1992) PNAS 89:5769-5773). O gene E6 é mais ativo na fibra, embora baixos níveis de produtos da transcrição sejam observados na folha, no óvulo e na flor.

[00241] A invenção pode utilizar promotores ativos no tecido fotossintético, por exemplo, com a finalidade de controlar a transcrição em tecidos verdes tais como folhas e caules, que são adequados quando controlam a expressão somente ou predominantemente em tais tecidos. Alternativamente, a invenção pode utilizar promotores para conferir expressão constitutiva ao longo de toda a planta ou diferencialmente em relação aos tecidos verdes ou diferencialmente em relação ao estágio do desenvolvimento do tecido verde no qual a expressão ocorre ou em resposta a estímulos externos.

[00242] Os exemplos de promotores utilizados na prática desta invenção incluem os promotores da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase

(RbcS) tal como o promotor RbcS da lariça ocidental (*Larix laricina*), o promotor cab6 de pinheiro (Yamamoto e outros (1994) *Plant Cell Physiol.* 35:773-778), o promotor do gene Cab-1 do trigo (Fejes e outros (1990) *Plant Mol. Biol.* 15:921-932), o promotor CAB-1 do espinafre (Lubberstedt e outros (1994) *Plant Physiol.* 104:997-1006), o promotor cab1R do arroz (Luan e outros (1992) *Plant Cell* 4:971-981), o promotor da piruvato ortofosfato diquinase (PPDK) do milho (Matsuoka e outros (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90:9586-9590), o promotor Lhcb1*2 do tabaco (Cerdan e outros (1997) *Plant Mol. Biol.* 33:245-255), o promotor do simportador de sacarose-H⁺ SUC2 de *Arabidopsis thaliana* (Truernit e outros (1995) *Planta* 196:564-570) e os promotores de proteína de membrana tilacóide do espinafre (psaD, psaF, psaE, PC, FNR, atpC, atpD, cab, rbcS). Outros promotores que controlam a transcrição em caules, folhas e tecido verde são descritos na Publicação de Patente U.S. Nº 2007/0006346, incorporada aqui como referência em sua totalidade.

[00243] Em algumas modalidades, a especificidade ao tecido de alguns promotores "preferidos para os tecidos" pode não ser absoluta e podem ser testados genes repórteres tal como Gus ou a proteína fluorescente verde, a proteína fluorescente azul esverdeada, a proteína fluorescente amarela ou a proteína fluorescente vermelha. Pode-se também conseguir a expressão preferida para os tecidos com expressão "com vazamento" através de uma combinação de promotores preferidos para os tecidos diferentes. Outros promotores preferidos para os tecidos podem ser isolados por um versado na técnica (ver a U.S. 5.589.379).

[00244] Em um aspecto, os promotores de plantas que podem ser induzidos após a exposição a hormônios vegetais, tais como auxinas, são utilizados para expressar os ácidos nucleicos da invenção. Por exemplo, a

invenção pode utilizar o fragmento do promotor E1 de elementos de resposta à auxina (AuxREs) na soja (*Glycine max* L.) (Liu (1997) *Plant Physiol.* 115:397-407); o promotor GST6 de *Arabidopsis* que responde à auxina (que também responde ao ácido salicílico e ao peróxido de hidrogênio) (Chen (1996) *Plant J.* 10: 955-966); o promotor parC do tabaco que pode ser induzido pela auxina (Sakai (1996) 37:906-913); um elemento de resposta à biotina vegetal (Streit (1997) *Mol. Plant Microbe Interact.* 10:933-937); e, o promotor que responde ao hormônio de estresse ácido abscísico (Sheen (1996) *Science* 274:1900-1902).

[00245] Os ácidos nucleicos da invenção também podem ser ligados de forma operacional com os promotores de plantas que podem ser induzidos após a expressão a reagentes químicos que podem ser aplicados na planta, tais como herbicidas e antibióticos. Por exemplo, sistemas de expressão gênica que são ativados na presença de um ligante químico, incluindo etanol, tais como os que podem ser encontrados na WO 96/27673; na WO 93/01294; na WO 94/03619; na WO 02/061102, das quais todas são incorporadas aqui como referência. Pode ser utilizado o promotor In2-2 do milho, ativado por agentes de segurança de herbicidas de benzenossulfonamida (De Veylder (1997) *Plant Cell Physiol.* 38:568-577); a aplicação de agentes de segurança de herbicidas diferentes induz padrões de expressão gênica distintos, incluindo a expressão na raiz, nos hidatódios e no meristema apical do broto. A sequência codificadora pode estar sob o controle, por exemplo, de um promotor da tetraciclina que pode ser induzido, por exemplo, como descrito com plantas de tabaco transgênicas que contêm o gene da arginina descarboxilase de *Avena sativa* L. (aveia) (Masgrau (1997) *Plant J.* 11:465-473); estrogênio, tal como o receptor de ecdisona (WO 01/52620) ou, um elemento que responde ao ácido salicílico

(Stange (1997) Plant J. 11:1315-1324). Utilizando promotores induzidos quimicamente (por exemplo, por hormônios ou pesticidas), isto é, um promotor que responde a um reagente químico que pode ser aplicado na planta transgênica no campo, a expressão de um polipeptídeo da invenção pode ser induzida em um estágio do desenvolvimento particular da planta.

[00246] Os exemplos de promotores constitutivos que podem ser utilizados na prática desta invenção e que foram descritos, incluem o da actina 1 do arroz (Wang e outros (1992) Mol. Cell. Biol., 12:3399; Patente U.S. No 5.641.876); de outras isoformas da actina (McElroy e outros (1990) Plant Cell 2: 163-171 e McElroy e outros (1991) Mol. Gen. Genet. 231: 150-160); 35S do CaMV (Odell e outros (1985) Nature, 313:810); 19S do CaMV (Lawton e outros (1987) Plant Mol. Biol. 9:315-324; Patente U.S. No 5.639.949); nos (Ebert e outros (1987) PNAS USA 84:5745-5749); Adh (Walker e outros (1987) PNAS USA 84:6624-6628), da sacarose sintase (Yang & Russell (1990) PNAS USA 87:4144-4148); e os promotores da ubiquitina (por exemplo, girassol - Binet e outros (1991) Plant Science 79: 87-94; milho - Christensen e outros (1989) Plant Molec. Biol. 12: 619-632; e Arabidopsis - Callis e outros, J. Biol. Chem. (1990) 265:12486-12493; e Norris e outros, Plant Mol. Biol. (1993) 21:895-906) .

[00247] Qualquer terminador da transcrição pode ser utilizado na prática desta invenção, por exemplo, pode ser utilizado em vetores, cassetes de expressão e similares. Estes são responsáveis pelo término da transcrição além do transgene e da poliadenilação do mRNA correto. A

região de término pode ser nativa em relação à região de início da transcrição, pode ser nativa em relação à sequência de DNA ligada de forma operacional de interesse, pode ser nativa em relação ao hospedeiro vegetal ou pode ser derivada de uma outra fonte (isto é, estranha ou heteróloga ao promotor, à sequência de DNA de interesse, ao hospedeiro vegetal ou a qualquer combinação dos mesmos). Os terminadores da transcrição apropriados são aqueles que são conhecidos por funcionarem em plantas e incluem o terminador 35S do CAMV, o terminador tml, o terminador da nopalina sintase e o terminador da rbcS E9 da ervilha. Estes podem ser utilizados tanto em monocotiledôneas quanto em dicotiledôneas. Em adição, pode ser utilizado um terminador da transcrição nativo do gene.

[00248] A invenção pode utilizar qualquer sequência para aumentar a expressão gênica partindo da unidade transcricional; e estas sequências podem ser utilizadas em associação com os genes desta invenção para aumentar a sua expressão nas plantas transgênicas. Por exemplo, foi mostrado que várias sequências intrônicas aumentam a expressão, particularmente em células de monocotiledôneas. Por exemplo, foi observado que os íntrons do gene *Adhl* do milho aumentam significativamente a expressão do gene do tipo selvagem sob seu promotor cognato quando introduzidos nas células de milho. Também é sabido que um número de sequências líderes não-traduzidas derivadas de vírus aumenta a expressão e estas são particularmente eficientes em células de dicotiledôneas. Especificamente, foi mostrado que as sequências líderes do Vírus Mosaico do Tabaco (TMV, a "sequência W"), do Vírus do Mosqueado Clorótico do Milho (MCMV) e do Vírus Mosaico da Alfafa (AMV) são eficientes no aumento da expressão (por exemplo, Gallie e outros Nucl. Acids Res. 15: 8693-8711 (1987); Skuzeski e outros Plant Molec. Biol. 15:

65-79 (1990)).

Direcionamento do Produto Gênico Dentro da Célula

[00249] Qualquer mecanismo para o direcionamento de produtos gênicos, por exemplo, nas plantas, pode ser utilizado na prática desta invenção e tais mecanismos são conhecidos por existirem em plantas e as sequências que controlam o funcionamento destes mecanismos foram caracterizadas em alguns detalhes. Foram caracterizadas as sequências que causam o direcionamento de produtos gênicos para outros compartimentos celulares. As sequências amino terminais podem ser responsáveis pelo direcionamento de uma proteína de interesse para qualquer compartimento celular, tal como, um vacúolo, uma mitocôndria, um peroxissomo, corpos proteicos, retículo endoplasmático, cloroplasto, grânulo de amido, amiloplasto, apoplasto ou parede celular de uma planta (por exemplo, Unger e outros *Plant Molec. Biol.* 13: 411-418 (1989); Rogers e outros (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6512-651; Patente U.S. No 7.102.057; WO 2005/096704, dos quais todos são incorporados aqui como referência). Opcionalmente, a sequência sinal pode ser uma sequência sinal N-terminal de waxy, uma sequência sinal N-terminal da γ -zeína, um domínio de ligação ao amido, um domínio de ligação ao amido C-terminal, uma sequência de direcionamento para o cloroplasto, que importa a proteína madura para o cloroplasto (Comai e outros (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 15104-15109; van den Broeck e outros (1985) *Nature* 313: 358-363; Patente U.S. No 5.639.949) ou uma sequência sinal de secreção partindo de células a aleurona (Koehler & Ho, *Plant Cell* 2: 769-783 (1990)). Adicionalmente, sequências amino terminais em associação com sequências carbóxi terminais são responsáveis pelo direcionamento vacuolar de produtos gênicos (Shinshi e outros (1990) *Plant Molec. Biol.* 14: 357-368).

[00250] Em um aspecto, a sequência sinal selecionada deve incluir o sítio de clivagem conhecido e a fusão construída deve levar em consideração quaisquer aminoácidos após o(s) sítio(s) de clivagem, que é(são) necessário(s) para a clivagem. Em alguns casos, este requerimento pode ser satisfeito pela adição de um número pequeno de aminoácidos entre o sítio de clivagem e o transgene ATG ou, alternativamente, pela substituição de alguns aminoácidos pela sequência do transgene. Estas técnicas de construção são bem conhecidas no assunto e são igualmente aplicáveis a qualquer compartimento celular.

[00251] Em um aspecto, os mecanismos descritos anteriormente para o direcionamento celular podem ser utilizados não somente em associação a seus promotores cognatos, mas também em associação com promotores heterólogos de forma a realizar uma meta de direcionamento à célula específica sob a regulação transcricional de um promotor que possui um padrão de expressão diferente daquele do promotor do qual o sinal de direcionamento é derivado.

[00252] Em suma, uma variedade de meios pode ser utilizada na prática desta invenção, incluindo quaisquer meios para conseguir a expressão recombinante da fitase em uma planta, semente, órgão ou qualquer parte da planta transgênica. Tais plantas e partes das plantas transgênicas são úteis como fontes da fitase expressa de forma recombinante, que pode ser utilizada diretamente em fontes contendo fitato. Alternativamente, a fitase expressa por plantas recombinantes pode ser extraída da fonte vegetal e, se desejado, purificada antes do contato com o substrato da fitase.

[00253] Dentro do contexto da presente invenção, as plantas que podem ser selecionadas (utilizadas na prática desta invenção) incluem, mas

não-estão limitadas a plantas de cultivo que produzem flores comestíveis tais como couve-flor (*Brassica oleracea*), alcachofra (*Cynara scolymus*), frutos tais como maçã (*Malus*, por exemplo, *domesticus*), banana (*Musa*, por exemplo, *acuminata*), bagas (tal como a groselha, *Ribes*, por exemplo, *rubrum*), cereja (tal como a cereja doce, *Prunus*, por exemplo, *avium*), pepino (*Cucumis*, por exemplo, *sativus*), uva (*Vitis*, por exemplo, *vinifera*), limão (*Citrus limon*), melão (*Cucumis melo*), nozes (tal como a noqueira, *Juglans*, por exemplo, *regia*; amendoim, *Arachis hypogaeae*), laranja (*Citrus*, por exemplo, *maxima*), pêssego (*Prunus*, por exemplo, *persica*), pêra (*Pyrus*, por exemplo, *communis*), ameixa (*Prunus*, por exemplo, *domestica*), morango (*Fragaria*, por exemplo, *moschata*), tomate (*Lycopersicon*, por exemplo, *esculentum*), folhas, tais como alfalfa (*Medicago*, por exemplo, *sativa*), repolho (por exemplo, *Brassica oleracea*), chicória (*Cichoreum*, por exemplo, *endivia*), alho poró (*Allium*, por exemplo, *porrum*), alface (*Lactuca*, por exemplo, *sativa*), espinafre (*Spinacia*, por exemplo, *oleraceae*), tabaco (*Nicotiana*, por exemplo, *tabacum*), raízes, tais como araruta (*Maranta*, por exemplo, *arundinacea*), beterraba (*Beta*, por exemplo, *vulgaris*), cenoura (*Daucus*, por exemplo, *carota*), mandioca (*Manihot*, por exemplo, *esculenta*), nabo (*Brassica*, por exemplo, *rapa*), rabanete (*Raphanus*, por exemplo, *sativus*), inhame (*Dioscorea*, por exemplo, *esculenta*), batata doce (*Ipomoea batatas*) e sementes, tais como feijão (*Phaseolus*, por exemplo, *vulgaris*), ervilha (*Pisum*, por exemplo, *sativum*), soja (*Glycin*, por exemplo, *max*), trigo (*Triticum*, por exemplo, *aestivum*), cevada (*Hordeum*, por exemplo, *vulgare*), milho (*Zea*, por exemplo, *mays*), arroz (*Oryza*, por exemplo, *sativa*), semente de colza (*Brassica napus*), painço (*Panicum* L.), girassol (*Helianthus annuus*), aveia (*Avena sativa*), tubérculos, tais como couve rábano (*Brassica*, por exemplo, *oleraceae*),

batata (*Solanum*, por exemplo, *tuberosum*) e similares.

[00254] Em um aspecto, os ácidos nucleicos e os polipeptídeos da invenção são expressos dentro ou inseridos em qualquer planta ou semente. As plantas transgênicas da invenção podem ser dicotiledôneas ou monocotiledôneas. Os exemplos de plantas transgênicas monocotiledôneas da invenção são gramíneas, tal como grama do prado (campim do campo, *Poa*), gramíneas forrageiras tais como festuca, lólio, gramíneas temperadas, tal como *Agrostis* e cereais, por exemplo, trigo, aveia, centeio, cevada, arroz, sorgo e milho. Os exemplos de plantas transgênicas dicotiledôneas da invenção são tabaco, verduras, tais como tremoços, batata, beterraba, ervilha, feijão e soja e plantas crucíferas (família *Brassicaceae*), tais como couve-flor, semente de colza e o organismo modelo intimamente relacionado *Arabidopsis thaliana*. Assim, as plantas e as sementes transgênicas da invenção incluem uma faixa ampla de plantas, incluindo, mas não-limitadas às espécies dos gêneros *Anacardium*, *Arachis*, *Asparagus*, *Atropa*, *Avena*, *Brassica*, *Citrus*, *Citrullus*, *Capsicum*, *Carthamus*, *Cocos*, *Coffea*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Daucus*, *Elaeis*, *Fragaria*, *Glycine*, *Gossypium*, *Helianassim*, *Heterocallis*, *Hordeum*, *Hyoscyamus*, *Lactuca*, *Linum*, *Lolium*, *Lupinus*, *Lycopersicon*, *Malus*, *Manihot*, *Majorana*, *Medicago*, *Nicotiana*, *Olea*, *Oryza*, *Panicum*, *Pennisetum*, *Persea*, *Phaseolus*, *Pistachia*, *Pisum*, *Pyrus*, *Prunus*, *Raphanus*, *Ricinus*, *Secale*, *Senecio*, *Sinapis*, *Solanum*, *Sorghum*, *Theobromus*, *Trigonella*, *Triticum*, *Vicia*, *Vitis*, *Vigna* e *Zea*.

[00255] Em modalidades alternativas, os ácidos nucleicos da invenção são expressos em plantas que contêm células de fibra, incluindo, por exemplo, algodão, árvore de paina (*Paina*, *Ceiba pentandra*), salgueiro do deserto, *Larrea tridentata*, *Eurotia lanata*, pau de balsa, rami, *Hibiscus cannabinus*, cânhamo, *Hibiscus sabdariffa*, juta, sisal abaca e linho. Em

modalidades alternativas, as plantas transgênicas da invenção podem ser membros do gênero *Gossypium*, incluindo membros de qualquer espécie de *Gossypium*, tais como *G. arboreum*; *G. herbaceum*, *G. barbadense* e *G. hirsutum*.

[00256] Plantas adicionais assim como sistemas de expressão sem ser vegetais podem ser utilizados na prática desta invenção. A escolha da espécie vegetal é primariamente determinada pelo uso pretendido da planta ou das partes da mesma e pela acessibilidade da espécie vegetal à transformação.

[00257] Estão disponíveis várias técnicas para a introdução da construção de expressão que contém a sequência de DNA que codifica a fitase nas plantas-alvo. As técnicas para a transformação de uma ampla variedade de espécies de plantas superiores são bem conhecidas e descritas na literatura técnica e científica. Ver, por exemplo, Weising (1988) *Ann. Rev. Genet.* 22:421-477; Patente U.S. Nº 5.750.870. Tais técnicas também podem incluir, mas não-estão limitadas à transformação de protoplastos utilizando o método de cálcio/polietileno glicol, eletroporação e microinjeção ou bombardeio de partículas (revestidas) (Potrykus, 1990). Em adição a estes assim chamados métodos de transformação direta de DNA, estão amplamente disponíveis sistemas de transformação que envolvem vetores, tais como vetores virais (por exemplo, do Vírus Mosaico da Couve-flor (CaMV)) e vetores bacterianos (por exemplo, do gênero *Agrobacterium*) (Potrykus, 1990). Após a seleção e/ou a classificação, os protoplastos, as células ou as partes das plantas que foram transformadas podem ser regeneradas em plantas inteiras, utilizando métodos conhecidos na técnica (Horsch e outros, 1985). A escolha das técnicas de transformação e/ou de regeneração não é crítica para esta invenção.

[00258] Os ácidos nucleicos e os constructos de expressão da invenção podem ser introduzidos em uma célula vegetal através de quaisquer meios. Em aspectos alternativos da prática desta invenção, é pretendido que o termo "introdução" no contexto de um polinucleotídeo, por exemplo, um constructo de nucleotídeos de interesse, signifique a apresentação à planta do polinucleotídeo de tal maneira que o polinucleotídeo tenha acesso ao interior de uma célula da planta. Quando mais de um polinucleotídeo deve ser introduzido, estes polinucleotídeos podem ser montados como parte de um único constructo de nucleotídeos ou como constructos de nucleotídeos separados e podem estar situados nos mesmo ou em vetores de transformação diferentes. Consequentemente, estes polinucleotídeos podem ser introduzidos na célula hospedeira de interesse em um único evento de transformação, em eventos de transformação separados ou, por exemplo, nas plantas, como parte de um protocolo de cruzamento. Os métodos da invenção não dependem de um método particular para introduzir um ou mais polinucleotídeos em uma planta, somente que o(s) polinucleotídeo(s) tenham acesso ao interior de pelo menos uma célula da planta. Os métodos para a introdução de polinucleotídeos nas plantas são conhecidos na técnica incluindo, mas não-limitados aos métodos de transformação transitória, aos métodos de transformação estável e aos métodos mediados por vírus.

[00259] A "transformação transitória" pode ser utilizada na prática desta invenção e em alguns aspectos no contexto de um polinucleotídeo é pretendido que signifique que um polinucleotídeo é introduzido na planta e não se integre no genoma da planta. "Introdução estável" ou "introduzido de forma estável" no contexto de um polinucleotídeo introduzido em uma planta pode ser utilizado na prática desta invenção e em alguns aspectos é

pretendido que o polinucleotídeo introduzido seja incorporado de forma estável no genoma da planta e assim a planta é transformada de forma estável com o polinucleotídeo.

[00260] "Transformação estável" ou "transformado de forma estável" no contexto de um polinucleotídeo introduzido em uma planta pode ser utilizado na prática desta invenção e em alguns aspectos é pretendido que um polinucleotídeo, por exemplo, um constructo de nucleotídeos descrito aqui, seja introduzido em uma planta integrado no genoma da planta e que seja capaz de ser herdado pela progênie da mesma, mais particularmente, pela progênie de várias gerações sucessivas. A introdução no genoma de uma planta desejada pode ser tal que a enzima é regulada pelos elementos endógenos de controle da transcrição ou da tradução. As técnicas de transformação tanto para monocotiledôneas quanto para dicotiledôneas são bem conhecidas no assunto.

[00261] Os ácidos nucleicos da invenção podem ser utilizados para conferir características desejadas a essencialmente qualquer planta. Em uma modalidade, a enzima da invenção pode ser expressa de tal maneira que a enzima não entrará em contato com seu substrato até desejado. Por exemplo, uma enzima da invenção pode ser direcionada e mantida no retículo endoplasmático de uma célula vegetal. A retenção da enzima, no retículo endoplasmático da célula, previnirá que a enzima entre em contato com seu substrato. A enzima e o substrato podem então ser colocados em contato através de quaisquer meios capazes de romper a arquitetura subcelular, tais como trituração, moagem, aquecimento e similares. Ver, WO 98/11235, WO 2003/18766 e WO 2005/096704, das quais todas são incorporadas aqui como referência.

[00262] Os genes marcadores que podem ser selecionados podem ser

adicionados ao constructo gênico com a finalidade de identificar células ou tecidos vegetais que possuem integrados de forma bem-sucedida o transgene. Isto pode ser necessário porque conseguir a incorporação e a expressão de genes em células vegetais é um evento raro, ocorrendo em apenas uma baixa porcentagem dos tecidos ou células-alvo. Os genes marcadores que podem ser selecionados codificam proteínas que fornecem resistência a agentes que são normalmente tóxicos às plantas, tais como antibióticos ou herbicidas. Apenas as células vegetais que possuem integradas o gene marcador que pode ser selecionado sobreviverão quando cultivadas em um meio contendo o antibiótico ou o herbicida apropriado. Os marcadores de seleção utilizados rotineiramente na transformação incluem o gene *nptII*, que confere resistência à canamicina e antibióticos relacionados (Messing & Vierra. *Gene* 19: 259-268 (1982); Bevan e outros, *Nature* 304:184-187 (1983)), o gene *bar*, que confere resistência ao herbicida fosfinotricina (White e outros, *Nucl. Acids Res* 18: 1062 (1990), Spencer e outros *Theor. Appl. Genet* 79: 625-631 (1990)), o gene *hph*, que confere resistência ao antibiótico higromicina (Blochinger & Diggelmann, *Mol Cell Biol* 4: 2929-2931), o gene *dhfr*, que confere resistência ao metotrexato (Bourouis e outros, *EMBO J.* 2(7): 1099-1104 (1983)), o gene EPSPS, que confere resistência ao glifosato (Patentes U.S. Nos 4.940.935 e 5.188.642).

[00263] Alternativamente, o material vegetal transgênico pode ser identificado através de um sistema de seleção positiva, tal como o sistema que utiliza o gene da manose-6-fosfato isomerase, que fornece a capacidade de metabolizar manose (Patentes U.S. Nos 5.767.378 e 5.994.629).

[00264] Em um aspecto, a produção de plantas ou sementes transgênicas compreende a incorporação de sequências da invenção e, opcionalmente, genes marcadores em um constructo de expressão alvo (por

exemplo, um plasmídeo), junto com o posicionamento do promotor e das sequências terminadoras. Isto pode envolver a transferência do gene modificado para dentro da planta através de um método adequado. Uma ou mais das sequências da invenção podem ser combinadas com sequências que conferem resistência a inseto, doença, seca, maior rendimento, maior qualidade nutricional do grão, maior rendimento de etanol e similares.

[00265] Por exemplo, uma construção pode ser introduzida diretamente no DNA genômico da célula vegetal utilizando técnicas tais como eletroporação e microinjeção de protoplastos de células vegetais ou os constructos podem ser introduzidos diretamente no tecido vegetal utilizando métodos de balística, tal como bombardeio de partículas de DNA. Por exemplo, ver, por exemplo, Christou (1997) *Plant Mol. Biol.* 35:197-203; Pawlowski (1996) *Mol. Biotechnol.* 6:17-30; Klein (1987) *Nature* 327:70-73; Takumi (1997) *Genes Genet. Syst.* 72:63-69, que discutem o uso de bombardeio de partículas para introduzir transgenes no trigo; e Adam (1997) *supra*, para o uso de bombardeio de partículas para introduzir YACs em células vegetais. Por exemplo, Rinehart (1997) *supra*, utilizaram o bombardeio de partículas para gerar plantas de algodão transgênicas. O aparato para a aceleração de partículas é descrito na Patente U.S. Nº 5.015.580; e, o instrumento de aceleração de partículas PDS-2000 BioRad (Biolistics) disponível comercialmente; ver também, John, Patente U.S. Nº 5.608.148; e Ellis, Patente U.S. Nº 5.681.730, que descrevem a transformação de gimnospermas mediada por partículas.

[00266] Em um aspecto, os protoplastos podem ser imobilizados e injetados com ácidos nucleicos, por exemplo, uma construção de expressão. Embora a regeneração da planta partindo de protoplastos não seja fácil com cereais, a regeneração da planta é possível em verduras utilizando

embriogênese somática partindo de calos derivados de protoplastos. Os tecidos organizados podem ser transformados com DNA utilizando a técnica de pistola gênica, em que o DNA é revestido em microprojéteis de tungstênio, disparados a 1/100^o do tamanho das células, que carregam o DNA profundamente para dentro das células e das organelas. O tecido transformado é então induzido à regeneração, geralmente através da embriogênese somática. Esta técnica tem sido bem-sucedida em várias espécies de cereais incluindo milho e arroz.

[00267] Os ácidos nucleicos, por exemplo, os constructos de expressão, também podem ser introduzidos nas células vegetais utilizando vírus recombinantes. As células vegetais podem ser transformadas utilizando vetores virais, tais como, por exemplo, vetores derivados do vírus mosaico do tabaco (Rouwendal (1997) *Plant Mol. Biol.* 33:989-999), ver, Porta (1996) "Use of viral replicons for the expression of genes in plants", *Mol. Biotechnol.* 5:209-221.

[00268] Alternativamente, os ácidos nucleicos, por exemplo, um constructo de expressão, podem ser combinados com regiões flanqueadoras do T-DNA adequadas e introduzida em um vetor hospedeiro de *Agrobacterium tumefaciens* convencional. As funções de virulência do hospedeiro de *Agrobacterium tumefaciens* direcionarão a inserção da construção e do marcador adjacente no DNA da célula vegetal quando a célula for infectada pelas bactérias. As técnicas de transformação mediadas por *Agrobacterium tumefaciens*, incluindo o desarmamento e o uso de vetores binários, são bem descritas na literatura científica. Ver, por exemplo, Horsch (1984) *Science* 233:496-498; Fraley (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4803 (1983); *Gene Transfer to Plants*, Potrykus, ed. (Springerlag, Berlin 1995). O DNA em uma célula de *A. tumefaciens* fica contido no

cromossomo bacteriano assim como em uma outra estrutura conhecida como um plasmídeo Ti (indutor de tumor). O plasmídeo Ti contém um pedaço de DNA denominado T-DNA (~20 kb de comprimento) que é transferido para a célula vegetal no processo de infecção e uma série de genes *vir* (virulência) que direcionam o processo de infecção. *A. tumefaciens* pode infectar uma planta apenas através de ferimentos: quando uma raiz ou caule da planta sofre ferimentos isto produz certos sinais químicos, em resposta aos quais, os genes *vir* de *A. tumefaciens* se tornam ativados e direcionam uma série de eventos necessários para a transferência do T-DNA do plasmídeo Ti para o cromossomo da planta. O T-DNA então entra na célula vegetal através dos ferimentos. Uma especulação é que o T-DNA espera até que o DNA da planta seja replicado ou transcrito, então se insere no DNA da planta exposto. Para utilizar *A. tumefaciens* como um vetor de transgenes, a seção indutora de tumor do T-DNA tem que ser removida, enquanto as regiões de borda do T-DNA e os genes *vir* são mantidos. O transgene é então inserido entre as regiões de borda do T-DNA, onde é transferido para a célula vegetal e se integra nos cromossomos da planta.

[00269] A invenção fornece a transformação de plantas monocotiledôneas utilizando os ácidos nucleicos da invenção, incluindo cereais importantes, ver Hiei (1997) *Plant Mol. Biol.* 35:205-218. Ver também, por exemplo, Horsch, *Science* (1984) 233:496; Fraley (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 80:4803; Thykjaer (1997) *supra*; Park (1996) *Plant Mol. Biol.* 32:1135-1148, que discutem a integração do T-DNA no DNA genômico. Ver também D'Halluin, Patente U.S. Nº 5.712.135, que descreve um processo para a integração estável de um DNA que compreende um gene que é funcional em uma célula de um cereal ou outra planta monocotiledônea.

[00270] Em um aspecto, a terceira etapa pode envolver a seleção e a regeneração de plantas inteiras capazes de transmitir o gene-alvo incorporado para a geração seguinte. Tais técnicas de regeneração se baseiam na manipulação de certos fitohormônios em um meio de cultura de tecido, tipicamente dependendo de um marcador biocida e/ou herbicida que foi introduzido junto com as sequências de nucleotídeos desejadas. A regeneração de plantas partindo dos protoplastos cultivados é descrito em Evans e outros, *Protoplasts Isolation and Culture*, Handbook of Plant Cell Culture, pp. 124-176, MacMillan Publishing Company, Nova York, 1983; e Binding, *Regeneration of Plants, Plant Protoplasts*, pp. 21-73, CRC Press, Boca Raton, 1985. A regeneração também pode ser obtida partindo de calos, explantes, órgãos vegetais ou partes dos mesmos. Tais técnicas de regeneração são descritas de forma geral em Klee (1987) *Ann. Rev. of Plant Phys.* 38:467-486. Para a obtenção de plantas inteiras partindo de tecidos transgênicos tais como embriões imaturos, estes podem ser cultivados sob condições ambientais controladas em uma série de meios que contêm nutrientes e hormônios, um processo conhecido como cultura de tecido. Uma vez que plantas inteiras foram geradas e produzem semente, começa a avaliação da progênie.

[00271] Em um aspecto, depois de o cassete de expressão estar incorporado de forma estável nas plantas transgênicas, este pode ser introduzido em outras plantas através de cruzamento sexual. Qualquer número de técnicas de cruzamento padronizadas pode ser utilizado, dependendo da espécie que será cruzada. Ver, por exemplo, Welsh J. R., *Fundamentals of Plant Genetics and Breeding*, John Wiley & Sons, NY (1981); *Crop Breeding*, Wood D. R. (Ed.) American Society of Agronomy Madison, Wis. (1983); Mayo O., *The Theory of Plant Breeding*, Segunda

Edição, Clarendon Press, Oxford (1987); Singh, D. P., Breeding for Resistance to Diseases and Insect Pests, Springer-Verlag, NY (1986); e Wricke e Weber, Quantitative Genetics and Selection Plant Breeding, Walter de Gruyter e Co., Berlin (1986).

[00272] Em um aspecto, uma vez que a expressão transgênica dos ácidos nucleicos da invenção leva a alterações fenotípicas, as plantas que compreendem os ácidos nucleicos recombinantes da invenção podem ser cruzadas sexualmente com uma segunda planta para a obtenção de um produto final. Assim, a semente da invenção pode ser derivada de um cruzamento entre duas plantas transgênicas da invenção ou um cruzamento entre uma planta da invenção e uma outra planta. Os efeitos desejados (por exemplo, expressão dos polipeptídeos da invenção para a produção de uma planta na qual o comportamento de florescência é alterado) podem ser intensificados quando ambas as plantas parentais expressam os polipeptídeos (por exemplo, fitase) da invenção. Os efeitos desejados podem ser passados para as gerações futuras de plantas através de meios de propagação padronizados.

[00273] Para as dicotiledôneas, pode ser utilizado um sistema de vetor binário (Hoekema e outros, 1983; EP 0120516 Schilperoort e outros). Por exemplo, podem ser utilizadas cepas de *Agrobacterium* que contêm um plasmídeo vir com os genes de virulência e um plasmídeo compatível contendo o constructo gênico que será transferido. Este vetor pode ser replicado tanto em *E. coli* quanto em *Agrobacterium* e é derivado do vetor binário Bin19 (Bevan, 1984) que é alterado em detalhes que não são relevantes para esta invenção. Os vetores binários que são utilizados neste exemplo contêm entre as sequências das bordas esquerda e direita do T-DNA, um gene NPTII idêntico que codifica resistência à canamicina

(Bevan, 1984) e um sítio de clonagem múltipla para clonar no mesmo os constructos gênicos requeridos.

[00274] A transformação e a regeneração de plantas de cultivo monocotiledôneas podem ser praticadas utilizando qualquer método ou procedimento padronizado; as monocotiledôneas são susceptíveis à transformação e plantas transgênicas férteis podem ser regeneradas partindo das células transformadas. Em um aspecto alternativo, as monocotiledôneas são transformadas através da transformação por *Agrobacterium*.

[00275] Em um aspecto, as plantas transgênicas de arroz podem ser obtidas utilizando o gene *hph* bacteriano, que codifica resistência à higromicina, como um marcador de seleção; o gene pode ser introduzido por eletroporação. Em um aspecto, as plantas de milho transgênicas podem ser obtidas através da introdução do gene *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*, que codifica fosfinotricina acetiltransferase (uma enzima que inativa o herbicida fosfinotricina), em células embrionárias de uma cultura em suspensão de milho através do microbombardeio de partículas. Em um aspecto, o material genético pode ser introduzido nos protoplastos da aleurona de plantas de cultivo monocotiledôneas tais como trigo e cevada. Em um aspecto, as plantas de trigo são regeneradas partindo da cultura em suspensão embrionária através da seleção apenas dos tecidos de calos embrionários compactos e nodulares envelhecidos para o estabelecimento das culturas em suspensão embrionária. Em um aspecto, a combinação com sistemas de transformação para estas plantas de cultivo possibilita a aplicação da presente invenção em monocotiledôneas. Estes métodos e outros métodos também podem ser aplicados para a transformação e para a regeneração de dicotiledôneas.

[00276] Na prática desta invenção, a expressão da construção de

fitase envolve detalhes tais como a transcrição do gene por polimerases da planta, a tradução de mRNA etc. que são conhecidos pelos versados na técnica das técnicas do DNA recombinante. Alguns detalhes relevantes para a prática de algumas modalidades desta invenção são discutidos aqui. As sequências reguladoras que são conhecidas ou que são observadas como causadoras da expressão da fitase podem ser utilizadas na presente invenção. A escolha das sequências reguladoras utilizadas pode depender da planta de cultivo alvo e/ou do órgão alvo de interesse. Tais sequências reguladoras podem ser obtidas partindo de plantas ou vírus de plantas ou podem ser sintetizadas quimicamente. Tais sequências reguladoras são promotores ativos no direcionamento da transcrição nas plantas, de forma constitutiva ou específica ao estágio e/ou ao tecido, dependendo do uso da planta ou de partes da mesma. Estes promotores incluem, mas não-estão limitados a promotores que exibem expressão constitutiva, tal como o promotor 35S do Vírus Mosaico da Couve-flor (CaMV) (Guilley e outros, 1982), aqueles para a expressão específica à folha, tal como o promotor do gene da subunidade pequena da ribulose biscofosfato carboxilase (Coruzzi e outros, 1984), aqueles para a expressão específica à raiz, tal como o promotor do gene da glutamina sintase (Tingey e outros, 1987), aqueles para a expressão específica à semente, tal como o promotor da cruciferina A de Brassica napus (Ryan e outros, 1989), aqueles para a expressão específica ao tubérculo, tal como o promotor da patatina de classe I da batata (Koster-Topfer e outros, 1989; Wenzler e outros, 1989) ou aqueles para a expressão específica ao fruto, tal como o promotor da poligalacturonase (PG) do tomate (Bird e outros, 1988).

[00277] Outras sequências reguladoras tais como sequências terminadoras e sinais de poliadenilação podem ser utilizados na prática desta invenção e podem incluir qualquer sequência

que funciona como tal em plantas, cuja escolha está dentro do nível do versado na técnica. Um exemplo de tais sequências é a região flanqueadora a 3' do gene da nopalina sintase (nos) de *Agrobacterium tumefaciens* (Bevan, supra). As sequências reguladoras também podem incluir sequências intensificadoras, tal como a encontrada no promotor 35S de CaMV e sequências estabilizadoras do mRNA tal como a sequência-líder do Vírus Mosaico da Alfafa (AIMV) RNA4 (Brederode e outros, 1980) ou quaisquer outras sequências que funcionam de uma maneira similar.

[00278] Em algumas modalidades, uma fitase da invenção é expressa em um ambiente que permite a estabilidade da proteína expressa. A escolha de compartimentos celulares, tal como citosol, retículo endoplasmático, vacúolo, corpo proteico ou espaço periplasmático pode ser utilizada para criar um ambiente estável, dependendo dos parâmetros biofísicos da fitase. Tais parâmetros incluem, mas não-estão limitados ao pH ótimo, à sensibilidade a proteases ou à sensibilidade à molaridade do compartimento preferido.

[00279] Em algumas modalidades, uma fitase da invenção é expressa no citoplasma; em algum aspecto, para a obtenção da expressão no citoplasma da célula, a enzima expressa não deve conter peptídeo sinal de secreção ou qualquer outra sequência de direcionamento. Para a expressão em cloroplastos e mitocôndrias, a enzima expressa deve conter o assim chamado peptídeo de trânsito específico para a importação para dentro destas organelas. As sequências de direcionamento que podem ser ligadas à enzima de interesse com a finalidade de atingir esse objetivo são conhecidas (Smeekens e outros, 1990; van den Broeck e outros, 1985; Wolter e outros, 1988). Se a atividade da enzima for desejada nos vacúolos, um peptídeo sinal de secreção tem que estar presente, assim como uma sequência de

direcionamento específica que direciona a enzima para estes vacúolos (Tague e outros, 1990). O mesmo é verdadeiro para os corpos proteicos nas sementes. A sequência de DNA que codifica a enzima de interesse deve ser modificada de tal maneira que a enzima pode exercer sua ação na localização desejada na célula.

[00280] Em algumas modalidades, para conseguir a expressão extracelular da fitase, o constructo de expressão da presente invenção utiliza uma sequência sinal de secreção. Embora as sequências sinais que são homólogas (nativas) à espécie vegetal hospedeira possam ser preferidas, sequências sinais heterólogas, isto é, aquelas que se originam de outra espécie de planta ou tem origem microbiana, também podem ser utilizadas. Tais sequências sinais são conhecidas pelos versados na técnica. As sequências sinais apropriadas que podem ser utilizadas dentro do contexto da presente invenção são divulgadas em Blobel e outros, 1979; Von Heijne, 1986; Garcia e outros, 1987; Sijmons e outros, 1990; Ng e outros, 1994; e Powers e outros, 1996).

[00281] Em algumas modalidades, todas as partes dos constructos de DNA relevantes (promotores, sequências reguladoras, secretoras, estabilizadoras, de direcionamento ou terminadoras) da presente invenção são modificadas, se desejado, para afetar suas características de controle utilizando métodos conhecidos pelos versados na técnica. As plantas que contêm fitase obtida através da presente invenção podem ser utilizadas para a obtenção de plantas ou órgãos vegetais com níveis de fitase ainda maiores. Por exemplo, pode ser possível a obtenção de tais plantas ou órgãos vegetais através do uso de técnicas de variação somoclonal ou através de técnicas de cruzamento. Tais técnicas são bem conhecidas pelos versados na técnica.

[00282] Em um aspecto, a presente invenção fornece um método (e

produtos do mesmo) para conseguir um sistema de superexpressão altamente eficiente de fitase e outras moléculas. Em um aspecto, a invenção fornece um método (e produtos do mesmo) para conseguir um sistema de superexpressão altamente eficiente de fitase e fosfatase ácida em pH 2,5 em *Trichoderma*. Este sistema resulta em composições de enzima que possuem utilidade particular na indústria alimentícia para animais. Detalhes adicionais em relação a esta abordagem estão na literatura pública e/ou são conhecidos pelo versado na técnica. Em um exemplo não-limitante particular, tal literatura disponível ao público inclui a EP 0659215 (W0 9403612 A1) (Nevalainen e outros), embora esta referência não ensine as moléculas inventivas do presente pedido de patente.

[00283] Em algumas modalidades, a invenção utiliza o reagrupamento *in vivo*, que pode ser concentrado nos processos "intermoleculares" referidos coletivamente como "recombinação", que em bactérias pode ser um fenômeno "dependente de RecA". A invenção pode ser baseada nos processos de recombinação de uma célula hospedeira para recombinar e reagrupar sequências ou a capacidade das células de mediar processos redutivos para diminuir a complexidade de sequências quase repetidas na célula por deleção. Este processo de "reagrupamento redutivo" ocorre através de um processo independente de RecA "intramolecular".

[00284] Portanto, em um outro aspecto da invenção, polinucleotídeos variantes podem ser gerados através do processo de reagrupamento redutivo. O método envolve a produção de constructos que contêm sequências consecutivas (sequências codificadoras originais), a inserção das mesmas em um vetor apropriado e a introdução subsequente do mesmo em uma introdução em uma célula hospedeira apropriada. O reagrupamento das identidades moleculares individuais ocorre através de processos

combinatórios entre as sequências consecutivas nas regiões de processamento das construções de homologia ou entre unidades quase repetidas. O processo de reagrupamento recombina e/ou reduz a complexidade e a extensão das sequências repetidas e resulta na produção de novas espécies moleculares. Vários tratamentos podem ser aplicados para aumentar a taxa de reagrupamento. Estes poderiam incluir o tratamento com luz ultravioleta ou reagentes químicos que danificam o DNA e/ou o uso de linhagens de células hospedeiras que exibem níveis maiores de "instabilidade genética". Assim o processo de reagrupamento pode envolver a recombinação homóloga ou a propriedade natural de sequências quase repetidas para direcionar a sua evolução.

[00285] A invenção também utiliza sequências repetidas ou "quase repetidas"; estas sequências podem desempenhar uma função da instabilidade genética. Na presente invenção, "quase repetições" são repetições que não-estão restritas a sua estrutura unitária original. As unidades quase repetidas podem ser apresentadas na forma de um arranjo de sequências em um constructo; unidades consecutivas de sequências similares. Uma vez ligadas, as junções entre as sequências consecutivas se tornam essencialmente invisíveis e a natureza quase repetitiva da construção resultante é agora contínua no nível molecular. O processo de deleção que a célula realiza para reduzir a complexidade do constructo resultante opera entre as sequências quase repetidas. As unidades quase repetidas fornecem um repertório praticamente ilimitado de moldes sobre os quais os eventos de deslizamento podem ocorrer. Os constructos que contêm as quase repetições fornecem assim eficientemente elasticidade molecular suficiente de forma que os eventos de deleção (e potencialmente de inserção) podem ocorrer virtualmente em qualquer lugar dentro das unidades quase repetitivas.

[00286] Em alguns aspectos, quando as sequências quase repetidas estão todas ligadas na mesma orientação, por exemplo, cabeça a cauda ou vice-versa, a célula não pode distinguir unidades individuais. Consequentemente, o processo redutivo pode ocorrer ao longo de todas as sequências. Em contraste, quando, por exemplo, as unidades são apresentadas cabeça a cabeça, ao invés de cabeça a cauda, a inversão traça os pontos finais da unidade adjacente de forma que a formação de deleção favorecerá a perda de unidades distintas. Assim, em um aspecto da invenção as sequências estão na mesma orientação. A orientação aleatória das sequências quase repetidas resultará na perda da eficiência de reagrupamento, enquanto que a orientação coerente das sequências oferecerá a maior eficiência. Entretanto, embora o fato de haver menos sequências contíguas na mesma orientação diminua a eficiência, isto ainda fornece elasticidade suficiente para a recuperação eficiente de novas moléculas. Os constructos podem ser produzidos com as sequências quase repetidas na mesma orientação para permitir a maior eficiência.

[00287] As sequências podem ser montadas em uma orientação cabeça a cauda utilizando qualquer um de uma variedade de métodos, incluindo os seguintes:

(a) Podem ser utilizados iniciadores que incluem uma cabeça poli-A e uma cauda poli-T que quando produzidos na forma de fita simples fornecem orientação. Isto é realizado possuindo as primeiras poucas bases dos iniciadores obtidas do RNA e então removidas facilmente com RNase H.

[00288] (b) Podem ser utilizados iniciadores que incluem sítios de clivagem por restrição únicos. Vários sítios, uma bateria de sequências únicas e etapas repetidas de síntese e ligação seriam necessários.

[00289] (c) As poucas bases internas do iniciador podem ser tioladas e uma exonuclease pode ser utilizada para produzir moléculas com cauda de forma apropriada.

[00290] Em alguns aspectos, a recuperação das sequências reagrupadas se baseia na identificação de vetores de clonagem com um RI reduzido. As sequências codificadoras reagrupadas podem então ser recuperadas através de amplificação. Os produtos são clonados novamente e expressos. A recuperação dos vetores de clonagem com RI reduzido pode ser realizada através de:

1) O uso de vetores mantidos apenas de forma estável quando o constructo tem complexidade reduzida;

2) A recuperação física de vetores encurtados através de procedimentos físicos. Neste caso, o vetor de clonagem é recuperado utilizando procedimentos de isolamento de plasmídeos padronizados e fracionado por tamanho em um gel de agarose ou uma coluna com uma faixa de pelo molecular baixo utilizando procedimentos padronizados;

3) A recuperação de vetores que contêm genes interrompidos que podem ser selecionados quando o tamanho do inserto diminui; e

4) O uso de técnicas de seleção direta com um vetor de expressão e a seleção apropriada.

[00291] As sequências codificadoras (por exemplo, genes) de organismos relacionados podem ser utilizadas na prática desta invenção e podem demonstrar um alto grau de homologia e codificam produtos proteicos bastante diversos. Estes tipos de sequências são particularmente úteis na presente invenção como quase repetições. Entretanto, embora os exemplos de protocolos discutidos a seguir demonstrem o reagrupamento de sequências codificadoras originais quase idênticas (quase repetições), este

processo não é limitado a tais repetições quase idênticas.

[00292] Uma vez formadas, os constructos podem ou não ser fracionados por tamanho em um gel de agarose de acordo com protocolos publicados, inseridas em um vetor de clonagem e transfectadas para dentro de uma célula hospedeira apropriada. As células são então propagadas e o "reagrupamento redutivo" é realizado. A taxa do processo de reagrupamento redutivo pode ser estimulada através da introdução de danos no DNA se desejado. O fato da redução no RI ser mediado pela formação de deleções entre sequências repetidas através de um mecanismo "intramolecular" ou mediado por eventos similares à recombinação através de mecanismos "intermoleculares" é irrelevante. O resultado final é um reagrupamento das moléculas em todas as combinações possíveis.

[00293] Em um aspecto, os métodos desta invenção compreendem a etapa adicional de classificação dos membros da biblioteca do grupo embaralhado para identificar membros da biblioteca embaralhada individuais que possuem a capacidade de se ligar ou de outra maneira interagir ou de catalisar uma reação particular (por exemplo, tal como a catálise da hidrólise de um fitato).

[00294] Em um aspecto, os polipeptídeos que são identificados partindo de tais bibliotecas podem ser utilizados com finalidades terapêuticas, para diagnóstico, de pesquisa e relacionadas (por exemplo, catalisadores, solutos para aumentar a osmolaridade de uma solução aquosa e similares) e/ou podem ser submetidos a um ou mais ciclos adicionais de embaralhamento e/ou seleção.

[00295] Em um outro aspecto, antes ou durante a recombinação ou o reagrupamento, os polinucleotídeos da invenção ou os polinucleotídeos gerados através do método descrito aqui podem ser submetidos a agentes ou

processos que promovem a introdução de mutações nos polinucleotídeos originais. A introdução de tais mutações aumentaria a diversidade dos polinucleotídeos híbridos resultantes e dos polipeptídeos codificados partindo dos mesmos. Os agentes ou os processos que promovem a mutagênese podem incluir, mas não-estão limitados a: (+)-CC-1065 ou um análogo sintético tal como (+)-CC-1065-(N3-Adenina, ver Sun e Hurley, 1992); um aduto de 4'-fluro-4-aminobifenila N-acetilado ou desacetilado capaz de inibir a síntese de DNA (ver, por exemplo, van de Poll e outros, 1992); ou um aduto de 4-aminobifenila N-acetilado ou desacetilado (ver também, van de Poll e outros, 1992, pp. 751-758); cromo trivalente, um sal de cromo trivalente, um aduto de DNA de hidrocarboneto aromático policíclico ("PAH") capaz de inibir a replicação do DNA, tal como 7-bromometil-benz[a]antraceno ("BMA"), tris(2,3--dibromopropil)fosfato ("Tris-BP"), 1,2-dibromo-3-cloropropano ("DBCP"), 2-bromoacroleína (2BA), benzo[a]pireno-7,8-di-hidrodiol-9-10-epóxido ("BPDE"), um sal de halogênio de platina(II), N-hidróxi-2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]-quinolina ("N-hidróxi-IQ") e N-hidróxi-2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-f]--piridina ("N-hidróxi-PhIP"). Um exemplo de meios para retardar ou para interromper a amplificação através da PCR consiste em luz UV, (+)-CC-1065 e (+)-CC-1065-(N3-Adenina). Particularmente, os meios abrangidos são adutos de DNA ou polinucleotídeos que compreendem os adutos de DNA do grupo de polinucleotídeos ou de polinucleotídeos, que podem ser liberados ou removidos através de um processo que inclui o aquecimento da solução que compreende os polinucleotídeos antes do processamento adicional.

[00296] Em um outro aspecto, a invenção está direcionada a um método de produção de proteínas recombinantes que possuem atividade

biológica através do tratamento de uma amostra que compreende polinucleotídeos moldes de fita dupla que codificam uma proteína do tipo selvagem sob condições de acordo com a invenção que fornecem a produção de polinucleotídeos híbridos ou reagrupados.

[00297] A invenção fornece ainda o uso de iniciadores de códons de propriedade (contendo uma sequência N,N,G/T degenerada) para a introdução de mutações pontuais em um polinucleotídeo, de forma a gerar um conjunto de polipeptídeos de progênie nos quais uma faixa ampla de substituições de aminoácidos isolados é representada em cada posição de aminoácido (mutagênese saturada no sítio gênico (GSSM)). Os oligos utilizados são compreendidos de forma contígua de uma primeira sequência homóloga, uma sequência N,N,G/T degenerada e opcionalmente uma segunda sequência homóloga. Os produtos da tradução da progênie a jusante provenientes do uso de tais oligos incluem todas as alterações de aminoácidos possíveis em cada sítio de aminoácido ao longo do polipeptídeo, porque a degeneração da sequência N,N,G/T inclui códons para todos os 20 aminoácidos.

[00298] Em um aspecto, um tal oligo degenerado (compreendido de um cassete N,N,G/T degenerado) é utilizado para submeter cada códon original em um molde de polinucleotídeo parental a uma faixa ampla de substituições de códons. Em um outro aspecto, pelo menos dois cassetes N,N,G/T degenerados são utilizados – no mesmo oligo ou não, para submeter pelo menos dois códons originais em um molde de polinucleotídeo parental a uma faixa ampla de substituições de códons. Assim, mais de uma sequência N,N,G/T pode estar contida em um oligo para a introdução de mutações de aminoácidos em mais de um sítio. Este grande número de sequências N,N,G/T pode ser diretamente contíguo ou separado por uma ou

mais sequências de nucleotídeos adicionais. Em um outro aspecto, os oligos úteis para a introdução de adições e deleções podem ser utilizados isoladamente ou em combinação com os códons que contêm uma sequência N,N,G/T, para a introdução de qualquer combinação ou permutação de adições, deleções e/ou substituições de aminoácidos.

[00299] Em um aspecto, é possível mutagenizar simultaneamente duas ou mais posições de aminoácidos contíguas utilizando um oligo que contém tripletos de N,N,G/T contíguos, isto é, uma sequência (N,N,G/T)_n degenerada.

[00300] Em um outro aspecto, a presente invenção fornece o uso de cassetes degenerados que possuem menos degeneração que a sequência N,N,G/T. Por exemplo, pode ser desejável em alguns casos utilizar (por exemplo, em um oligo) uma sequência em triplete degenerada compreendida de apenas um N, em que o dito N pode estar na primeira, na segunda ou na terceira posição do triplete. Quaisquer outras bases incluindo quaisquer combinações e permutações das mesmas podem ser utilizadas nas duas posições restantes do triplete. Alternativamente, pode ser desejável em alguns casos utilizar (por exemplo, em um oligo) uma sequência em triplete de N,N,N degenerada ou uma sequência em triplete de N,N,G/C.

[00301] É considerado, entretanto, que o uso de um triplete degenerado (tal como uma sequência em triplete de N,N,G/T ou de N,N,G/C) como divulgado na presente invenção é vantajoso por várias razões. Em um aspecto, esta invenção fornece um meio para gerar de forma sistemática e bastante fácil a substituição da faixa ampla de aminoácidos possíveis (para um total de 20 aminoácidos) em cada e toda posição de aminoácido em um polipeptídeo. Assim, para um polipeptídeo de 100 aminoácidos, a invenção fornece uma maneira de gerar de forma sistemática

e bastante fácil 2000 espécies distintas (isto é, 20 aminoácidos possíveis por posição vezes 100 posições de aminoácidos). É considerado que são fornecidas, através do uso de um oligo que contém uma sequência N,N,G/T degenerada ou um triplete de N,N,G/C, 32 sequências individuais que codificam 20 aminoácidos possíveis. Assim, em um recipiente de reação no qual uma sequência de polinucleotídeos parental é submetida à mutagênese por saturação utilizando um tal oligo, são gerados 32 polinucleotídeos de progênie distintos que codificam 20 polipeptídeos distintos. Em contraste, o uso de um oligo não-degenerado na mutagênese direcionada ao sítio leva apenas a um produto polipeptídico de progênie por recipiente de reação.

[00302] Esta invenção fornece ainda o uso de oligos não-degenerados, que podem ser opcionalmente utilizados em combinação com os iniciadores degenerados divulgados. É considerado que em algumas situações, é vantajoso utilizar oligos não-degenerados para gerar mutações pontuais específicas em um polinucleotídeo de trabalho. Isto fornece um meio gerar mutações pontuais silenciosas específicas, mutações pontuais que levam a alterações de aminoácidos correspondentes e a mutações pontuais que causam a produção de códons de término (stop) e a expressão correspondente de fragmentos de polipeptídeos.

[00303] Assim, em um aspecto, cada recipiente de reação de mutagênese por saturação contém polinucleotídeos que codificam pelo menos 20 moléculas de polipeptídeos de progênie de forma que todos os 20 aminoácidos são representados na posição de aminoácido específica que corresponde à posição do códon que sofreu mutagênese no polinucleotídeo parental. Os polipeptídeos de progênie degenerados 32 vezes gerados partindo de cada recipiente de reação de mutagênese por saturação podem ser submetidos à amplificação clonal (por exemplo, clonados em um

hospedeiro de *E. coli* adequado utilizando um vetor de expressão) e submetidos à classificação da expressão. Quando um polipeptídeo de progênie individual é identificado através da classificação como exibindo uma alteração favorável em relação a uma propriedade (quando comparado com o polipeptídeo parental), este pode ser sequenciado para identificar a substituição de aminoácido favorável correspondente contida no mesmo.

[00304] É considerado que após a mutagênese de cada e toda a posição de aminoácido em um polipeptídeo parental utilizando mutagênese por saturação no sítio gênico (GSSM) como divulgado aqui, alterações de aminoácidos favoráveis podem ser identificadas em mais de uma posição de aminoácido. Pode ser gerada uma ou mais novas moléculas de progênie que contêm uma combinação de todas ou de parte destas substituições de aminoácidos favoráveis. Por exemplo, se 2 alterações de aminoácidos favoráveis específicas forem identificadas em cada uma de 3 posições de aminoácidos em um polipeptídeo, as permutações incluem 3 possibilidades em cada posição (nenhuma alteração no aminoácido original e cada uma das duas alterações favoráveis) e 3 posições. Assim, há $3 \times 3 \times 3$ ou 27 possibilidades totais, incluindo 7 que foram verificadas anteriormente – 6 mutações pontuais isoladas (isto é, 2 em cada uma das três posições) e nenhuma alteração em qualquer posição.

[00305] Ainda em um outro aspecto, a mutagênese por saturação no sítio pode ser utilizada junto com embaralhamento, quimerização, recombinação e outros processos de mutagênese, junto com a classificação. Esta invenção fornece o uso de qualquer(qualsquer) processo(s) de mutagênese, incluindo a mutagênese por saturação, de uma maneira iterativa. Em um exemplo, o uso iterativo de qualquer(qualsquer) processo(s) de mutagênese é feito em combinação com a classificação.

[00306] Assim, em um exemplo não-limitante, os polinucleotídeos e os polipeptídeos da invenção podem ser derivados da mutagênese por saturação no sítio gênico (GSSM) em combinação com processos de mutagênese adicionais, tal como um processo em que dois ou mais polinucleotídeos relacionados são introduzidos em uma célula hospedeira adequada de forma que um polinucleotídeo híbrido é gerado através da recombinação e do reagrupamento redutivo.

[00307] Em adição à realização da mutagênese ao longo da sequência inteira de um gene, a mutagênese pode ser utilizada para substituir cada um de um número de bases em uma sequência de polinucleotídeos, em que o número de bases que será submetido à mutagênese pode ser cada número inteiro de 15 até 100.000. Assim, ao invés de submeter cada posição ao longo de uma molécula à mutagênese, é possível submeter cada uma ou um número distinto de bases (pode ser um subconjunto que totaliza de 15 até 100.000) à mutagênese. Um nucleotídeo separado pode ser utilizado para a mutagênese de cada posição ou grupo de posições ao longo de uma sequência de polinucleotídeos. Um grupo de 3 posições que será submetido à mutagênese pode ser um códon. As mutações podem ser introduzidas utilizando um iniciador mutagênico, que contém um cassete heterólogo, também referido como um cassete mutagênico. Os exemplos de cassetes podem ter de 1 até 500 bases. Cada posição de nucleotídeo em tais cassetes heterólogos pode ser N, A, C, G, T, A/C, A/G, A/T, C/G, C/T, G/T, C/G/T, A/G/T, A/C/T, A/C/G ou E, em que E é qualquer base que não é A, C, G ou T (E pode ser referido como um oligo de planejamento).

[00308] Em um sentido geral, a mutagênese por saturação compreende a mutagênese de um conjunto completo de cassetes mutagênicos (em que cada cassete pode ter aproximadamente 1-500 bases de

comprimento) na sequência de polinucleotídeos definida que será submetida à mutagênese (em que a sequência que será submetida à mutagênese pode ter de aproximadamente 15 até 100.000 bases de comprimento). Assim, um grupo de mutações (que varia de 1 até 100 mutações) é introduzido em cada cassete que será submetido à mutagênese. Um grupo de mutações que será introduzido em um cassete pode ser diferente ou o mesmo de um segundo grupo de mutações que será introduzido em um segundo cassete durante a aplicação de uma rodada de mutagênese por saturação. Tais grupos são exemplificados por deleções, adições, agrupamentos de códons particulares e agrupamentos de cassetes de nucleotídeos particulares.

[00309] As sequências definidas que serão submetidas à mutagênese incluem um gene inteiro, uma via, um cDNA, um quadro aberto de leitura (ORF) inteiro e um promotor inteiro, um intensificador, um repressor/transativador, uma origem de replicação, um íntron, um operador ou qualquer grupo funcional de polinucleotídeo. Geralmente, "sequências definidas" para esta finalidade podem ser qualquer polinucleotídeo tal como uma sequência de polinucleotídeos de 15 bases e sequências de polinucleotídeos de comprimentos entre 15 bases e 15.000 bases (esta invenção cita especificamente cada número inteiro intermediário). As considerações na escolha dos grupos de códons incluem tipos de aminoácidos codificados por um cassete mutagênico degenerado.

[00310] Em um aspecto, um grupo de mutações que pode ser introduzido em um cassete mutagênico, esta invenção fornece especificamente substituições de códons degenerados (utilizando oligos degenerados) que codificam 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 e 20 aminoácidos em cada posição e uma biblioteca de polipeptídeos codificada pelos mesmos.

[00311] Em aspectos alternativos, os ácidos nucleicos da invenção compreendem DNA, incluindo cDNA, DNA genômico e DNA sintético. O DNA pode ser de fita dupla ou de fita simples e se for de fita simples pode ser a fita codificadora ou a fita não-codificadora (antissenso). Alternativamente, os ácidos nucleicos da invenção podem compreender RNA.

[00312] Como discutido em mais detalhes a seguir, as sequências de ácidos nucleicos isoladas da invenção podem ser utilizadas para preparar os polipeptídeos da invenção.

[00313] Consequentemente, um outro aspecto da invenção é uma sequência de ácido nucleico isolada que codifica um polipeptídeo da invenção. Uma sequência de ácido nucleico da invenção pode compreender sequências codificadoras adicionais, tais como sequências líderes ou sequências de pró-proteínas e sequências não-codificadoras, tais como introns ou sequências não-codificadoras a 5' e/ou a 3' da sequência codificadora. Assim, como utilizado aqui, o termo "polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo" abrange um polinucleotídeo que inclui apenas a sequência codificadora para o polipeptídeo assim como um polinucleotídeo que inclui sequência codificadora e/ou não-codificadora adicional.

[00314] Alternativamente, as sequências de ácidos nucleicos da invenção podem ser submetidas à mutagênese utilizando técnicas convencionais, tal como a mutagênese direcionada ao sítio ou outras técnicas familiares aos versados na técnica, para introduzir alterações silenciosas no polinucleotídeo da invenção. Como utilizado aqui, "alterações silenciosas" incluem, por exemplo, alterações que não modificam a sequência de aminoácidos codificada pelo polinucleotídeo. Tais alterações podem ser desejáveis para aumentar o nível do polipeptídeo produzido pelas células

hospedeiras que contêm um vetor que codifica o polipeptídeo através da introdução de códons ou de pares de códons que ocorrem frequentemente no organismo hospedeiro.

[00315] A invenção refere-se ainda a polinucleotídeos que possuem alterações de nucleotídeos que resultam em substituições, adições, deleções, fusões e truncamentos de aminoácidos nos polipeptídeos da invenção. Tais alterações de nucleotídeos podem ser introduzidas utilizando técnicas tais como mutagênese direcionada ao sítio, mutagênese química aleatória, deleção através da exonuclease III e outras técnicas de DNA recombinante.

[00316] Quando necessário, as condições que permitem que a sonda se hibridize especificamente com sequências complementares podem ser determinadas colocando a sonda em contato com as sequências complementares de amostras conhecidas por conterem a sequência complementar assim como sequências de controle que não contêm a sequência complementar. As condições de hibridização, tal como a concentração de sal do tampão de hibridização, a concentração de formamida do tampão de hibridização ou a temperatura de hibridização, podem ser variadas para a identificação de condições que permitem que a sonda se hibridize especificamente com ácidos nucleicos complementares.

[00317] Se a amostra contiver o organismo do qual o ácido nucleico foi isolado, a hibridização específica da sonda é então detectada. A hibridização pode ser detectada através da marcação da sonda com um agente que pode ser detectado tal como um isótopo radioativo, um corante fluorescente ou uma enzima capaz de catalisar a formação de um produto que pode ser detectado.

[00318] Muitos métodos para a utilização das sondas marcadas para a detecção da presença de ácidos nucleicos complementares em uma amostra

são familiares aos pelos versados na técnica. Estes incluem Southern Blots, Northern Blots, procedimentos de hibridização de colônias e dot blots. Os protocolos para cada um destes procedimentos são fornecidos em Ausubel e outros Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley 503 Sons, Inc. 1997 e Sambrook e outros, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[00319] Alternativamente, mais de uma sonda (pelo menos uma que é capaz de se hibridizar especificamente a quaisquer sequências complementares que estão presentes na amostra de ácido nucleico), pode ser utilizada em uma reação de amplificação para determinar se a amostra contém um organismo que contém uma sequência de ácido nucleico da invenção (por exemplo, um organismo do qual o ácido nucleico foi isolado). Tipicamente, as sondas compreendem oligonucleotídeos. Em um aspecto, a reação de amplificação pode compreender uma reação de PCR. Os protocolos de PCR são descritos em Ausubel e Sambrook, supra. Alternativamente, a amplificação pode compreender uma reação em cadeia da ligase, 3SR ou uma reação de deslocamento de fita. (Ver Barany, F., "The Ligase Chain Reaction in a PCR World", PCR Methods and Applications 1:5-16, 1991; E. Fahy e outros, "Self-sustained Sequence Replication (3SR): An Isothermal Transcription-based Amplification System Alternative to PCR", PCR Methods and Applications 1:25-33, 1991; e Walker G.T. e outros, "Strand Displacement Amplification-an Isothermal in vitro DNA Amplification Technique", Nucleic Acid Research 20:1691-1696, 1992). Em tais procedimentos, os ácidos nucleicos na amostra são colocados em contato com as sondas, a reação de amplificação é realizada e qualquer produto de amplificação resultante é detectado. O produto de amplificação pode ser detectado através da realização de uma eletroforese em gel com os produtos

de reação e da coloração do gel com um agente de intercalação tal como o brometo de etídio. Alternativamente, uma ou mais das sondas podem ser marcadas com um isótopo radioativo e a presença de um produto de amplificação radioativo pode ser detectada através de autorradiografia após a eletroforese em gel.

[00320] As sondas derivadas de sequências próximas às extremidades de uma sequência da invenção também podem ser utilizadas em procedimentos de caminhada cromossômica para a identificação de clones que contêm sequências genômicas localizadas adjacentes às sequências de ácidos nucleicos como apresentado anteriormente. Tais métodos permitem o isolamento de genes que codificam proteínas adicionais do organismo hospedeiro.

[00321] Uma sequência de ácido nucleico da invenção pode ser utilizada como uma sonda para a identificação e para o isolamento de ácidos nucleicos relacionados. Em alguns aspectos, os ácidos nucleicos relacionados podem ser cDNAs ou DNAs genômicos de organismos sem ser aqueles dos quais o ácido nucleico foi isolado. Por exemplo, os outros organismos podem ser organismos relacionados. Em tais procedimentos, uma amostra de ácido nucleico é colocada em contato com a sonda sob condições que permitem que a sonda se hibridize especificamente com sequências relacionadas. A hibridização da sonda com os ácidos nucleicos do organismo relacionado é então detectada utilizando qualquer um dos métodos descritos anteriormente.

[00322] Nas reações de hibridização de ácidos nucleicos, as condições utilizadas para atingir um nível particular de estringência variarão, dependendo da natureza dos ácidos nucleicos que serão hibridizados. Por exemplo, o comprimento, o grau de complementaridade, a composição da

sequência de nucleotídeos (por exemplo, teor de GC v. AT) e o tipo de ácido nucleico (por exemplo, RNA v. DNA) das regiões de hibridização dos ácidos nucleicos podem ser considerados na seleção das condições de hibridização. Uma consideração adicional é se um dos ácidos nucleicos está imobilizado, por exemplo, sobre um filtro.

[00323] A hibridização pode ser realizada sob condições de estringência baixa, de estringência moderada ou de estringência alta. Como um exemplo de hibridização de ácidos nucleicos, uma membrana polimérica contendo ácidos nucleicos desnaturados imobilizados é primeiramente pré-hibridizada durante 30 minutos a 45°C em uma solução que consiste em NaCl a 0,9 M, NaH₂PO₄ a 50 mM, pH 7,0, Na₂EDTA a 5,0 mM, 0,5% de SDS, 10X de Denhardt e 0,5 mg/mL de ácido polirriboadenílico. Aproximadamente 2 x 10⁷ cpm (atividade específica de 4-9 x 10⁸ cpm/μg) de sonda de oligonucleotídeo marcada na extremidade com ³²P são então adicionadas na solução. Após 12-16 horas de incubação, a membrana é lavada durante 30 minutos à temperatura ambiente em 1X SET (150 mM de NaCl, 20 mM de cloridrato de Tris, pH 7,8, 1 mM de Na₂EDTA) contendo 0,5% de SDS, seguido por uma lavagem de 30 minutos em 1X SET fresco a T_m-10°C para a sonda de oligonucleotídeo. A membrana é então exposta a um filme autorradiográfico para a detecção de sinais de hibridização.

[00324] Variando a estringência das condições de hibridização utilizadas para a identificação dos ácidos nucleicos, tais como cDNAs ou DNA genômicos, que se hibridizam com a sonda que pode ser detectável, os ácidos nucleicos que possuem níveis diferentes de homologia em relação à sonda podem ser identificados e isolados. A estringência pode ser variada através da realização da hibridização a temperaturas variáveis abaixo das temperaturas da fusão das sondas. A temperatura de fusão, T_m, é a

temperatura (sob força iônica e pH definidos) em que 50% da sequência alvo se hibridiza com uma sonda perfeitamente complementar. As condições muito estridentes são selecionadas para serem equivalentes a ou aproximadamente 5°C abaixo da T_m para uma sonda particular. A temperatura de fusão da sonda pode ser calculada utilizando as fórmulas a seguir: Para sondas entre 14 e 70 nucleotídeos de comprimento, a temperatura de fusão (T_m) é calculada utilizando a fórmula: $T_m = 81,5 + 16,6(\log [Na^+]) + 0,41(\text{fração de G+C}) - (600/N)$, em que N é o comprimento da sonda. Se a hibridização for realizada em uma solução que contém formamida, a temperatura de fusão pode ser calculada utilizando a equação: $T_m = 81,5 + 16,6(\log [Na^+]) + 0,41(\text{fração de G+C}) - (0,63\% \text{ de formamida}) - (600/N)$, em que N é o comprimento da sonda. A pré-hibridização pode ser realizada em 6X SSC, 5X reagente de Denhardt, 0,5% de SDS, 100 µg/mL de DNA de esperma de salmão fragmentado desnaturado ou 6X SSC, 5X reagente de Denhardt, 0,5% de SDS, 100 µg/mL de DNA de esperma de salmão fragmentado desnaturado, 50% de formamida. As fórmulas para as soluções de SSC e Denhardt podem ser encontradas, por exemplo, em Sambrook e outros, supra.

[00325] A hibridização é realizada através da adição da sonda que pode ser detectada nas soluções de pré-hibridização listadas anteriormente. Quando a sonda compreende DNA de fita dupla, esta é desnaturada antes da adição na solução de hibridização. O filtro é colocado em contato com a solução de hibridização durante um período de tempo suficiente para permitir que a sonda se hibridize com os cDNAs ou os DNAs genômicos que contêm sequências complementares à mesma ou homólogas à mesma. Para sondas com mais de 200 nucleotídeos de comprimento, a hibridização pode ser realizada 15-25°C abaixo da T_m . Para sondas mais curtas, tais

como sondas de oligonucleotídeos, a hibridização pode ser realizada 5-10°C abaixo da T_m . Tipicamente, para hibridizações em 6X SSC, a hibridização é realizada a aproximadamente 68°C. Geralmente, para hibridizações em soluções contendo 50% de formamida, a hibridização é realizada a aproximadamente 42°C. Todas as hibridizações anteriores são consideradas como ocorrendo sob condições de estringência alta.

[00326] Após a hibridização, o filtro é lavado para remover qualquer sonda que pode ser detectada ligada de forma não específica. A estringência utilizada para lavar os filtros também pode ser variada dependendo da natureza dos ácidos nucleicos que serão hibridizados, do comprimento dos ácidos nucleicos que serão hibridizados, do grau de complementaridade, da composição da sequência de nucleotídeos (por exemplo, teor de GC v. AT) e do tipo ácido nucleico (por exemplo, RNA v. DNA). Os exemplos de lavagens em condições de estringência progressivamente maiores são os seguintes: 2X SSC, 0,1% de SDS à temperatura ambiente durante 15 minutos (estringência baixa); 0,1X SSC, 0,5% de SDS à temperatura ambiente durante 30 minutos até 1 hora (estringência moderada); 0,1X SSC, 0,5% de SDS durante 15 até 30 minutos entre a temperatura de hibridização e 68°C (estringência alta); e NaCl a 0,15 M durante 15 minutos a 72°C (estringência muito alta). Uma lavagem com estringência baixa final pode ser realizada em 0,1X SSC à temperatura ambiente. Os exemplos anteriores são meramente ilustrativos de um conjunto de condições que podem ser utilizadas para lavar os filtros. Um versado na técnica saberia que há várias receitas para lavagens com estringências diferentes. Alguns outros exemplos são fornecidos a seguir.

[00327] Os ácidos nucleicos que se hibridizaram com a sonda podem ser identificados através de autorradiografia ou outras técnicas

convencionais.

[00328] O procedimento anterior pode ser modificado para identificar os ácidos nucleicos que possuem níveis menores de homologia em relação à sequência da sonda. Por exemplo, para a obtenção de ácidos nucleicos de homologia menor em relação à sonda que pode ser detectada, podem ser utilizadas condições menos estridentes. Por exemplo, a temperatura de hibridização pode ser diminuída em valores de 5°C partindo de 68°C até 42°C em um tampão de hibridização que possui uma concentração de Na⁺ de aproximadamente 1 M. Após a hibridização, o filtro pode ser lavado com 2X SSC, 0,5% de SDS na temperatura de hibridização. Estas condições são consideradas como sendo condições "moderadas" acima de 50°C e condições "baixas" abaixo de 50°C. Um exemplo específico de condições de hibridização "moderadas" é quando a hibridização anterior é realizada a 55°C. Um exemplo específico de condições de hibridização de "estruturância baixa" é quando a hibridização anterior é realizada a 45°C.

[00329] Alternativamente, a hibridização pode ser realizada em tampões, tal como 6X SSC, que contém formamida a uma temperatura de 42°C. Neste caso, a concentração de formamida no tampão de hibridização pode ser reduzida em valores de 5% partindo de 50% até 0% para o isolamento de clones que possuem níveis menores de homologia em relação à sonda. Após a hibridização, o filtro pode ser lavado com 6X SSC, 0,5% de SDS a 50°C. Estas condições são consideradas como sendo condições "moderadas" acima de 25% de formamida e condições "baixas" abaixo de 25% de formamida. Um exemplo específico de condições de hibridização "moderadas" é quando a hibridização anterior é realizada em 30% de formamida. Um exemplo específico de condições de hibridização de "estruturância baixa" é quando a hibridização anterior é realizada em 10% de

formamida.

[00330] Por exemplo, os métodos anteriores podem ser utilizados para isolar os ácidos nucleicos que possuem uma sequência com pelo menos aproximadamente 99%, pelo menos 98%, pelo menos 97%, pelo menos 95%, pelo menos 90% ou pelo menos 80% de homologia em relação a uma sequência de ácido nucleico que é apresentada na SEQ ID NO: 1, sequências substancialmente idênticas à mesma ou fragmentos que compreendem pelo menos aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400 ou 500 bases consecutivas da mesma e as sequências complementares a qualquer uma das sequências anteriores. A homologia pode ser medida utilizando um algoritmo de alinhamento. Por exemplo, os polinucleotídeos homólogos podem ter uma sequência codificadora que é uma variação alélica que ocorre naturalmente de uma das sequências codificadoras descritas aqui. Tais variações alélicas podem ter uma substituição, uma deleção ou uma adição de um ou mais nucleotídeos quando comparadas com uma sequência de ácido nucleico que é apresentada na SEQ ID NO: 1 ou sequências complementares à mesma.

[00331] Adicionalmente, os procedimentos anteriores podem ser utilizados para isolar ácidos nucleicos que codificam polipeptídeos que possuem pelo menos aproximadamente 99%, pelo menos 95%, pelo menos 90%, pelo menos 85%, pelo menos 80% ou pelo menos 70% de homologia em relação a um polipeptídeo que possui uma sequência que é apresentada na SEQ ID NO: 2, sequências substancialmente idênticas à mesma ou fragmentos que compreendem pelo menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100 ou 150 aminoácidos consecutivos da mesma como determinado utilizando um algoritmo de alinhamento de sequências (por exemplo, tal como o algoritmo FASTA versão 3.0t78 com os parâmetros

preestabelecidos).

[00332] Um outro aspecto da invenção é um polipeptídeo isolado ou purificado que compreende uma sequência que é apresentada na SEQ ID NO: 1, sequências substancialmente idênticas à mesma ou fragmentos que compreendem pelo menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100 ou 150 aminoácidos consecutivos da mesma. Como discutido anteriormente, tais polipeptídeos podem ser obtidos através da inserção de um ácido nucleico que codifica o polipeptídeo em um vetor de forma que a sequência codificadora fique ligada de forma operacional a uma sequência capaz de controlar a expressão do polipeptídeo codificado em uma célula hospedeira adequada. Por exemplo, o vetor de expressão pode compreender um promotor, um sítio de ligação de ribossomos para o início da tradução e um terminador da transcrição. O vetor também pode incluir sequências apropriadas para amplificar a expressão.

[00333] Os promotores adequados para a expressão do polipeptídeo ou de um fragmento do mesmo em bactérias incluem os promotores lac ou trp de E. coli, o promotor lacI, o promotor lacZ, o promotor T3, o promotor T7, o promotor gpt, o promotor lambda PR, o promotor lambda PL, promotores de operons que codificam enzimas glicolíticas tal como a 3-fosfoglicerato quinase (PGK) e o promotor da fosfatase ácida. Os promotores fúngicos incluem o promotor do fator $\forall$. Os promotores eucarióticos incluem o promotor inicial intermediário do CMV, o promotor da timidina quinase do HSV, promotores de choque térmico, o promotor SV40 inicial e tardio, LTRs de retrovírus e o promotor da metalotioneína-I de camundongo. Outros promotores conhecidos por controlarem a expressão de genes em células procarióticas ou eucarióticas ou seus vírus também podem ser utilizados.

[00334] Os vetores de expressão de mamífero também podem compreender uma origem de replicação, quaisquer sítios de ligação de ribossomos necessários, um sítio de poliadenilação, sítios doadores e receptores de processamento, sequências de término da transcrição e sequências não-transcritas flanqueadoras 5'. Em alguns aspectos, as sequências de DNA derivadas dos sítios de combinação e de poliadenilação do SV40 podem ser utilizadas para fornecer os elementos genéticos não-transcritos necessários.

[00335] Os vetores para a expressão do polipeptídeo ou de um fragmento do mesmo em células eucarióticas também podem conter intensificadores para aumentar os níveis de expressão. Os intensificadores são elementos de DNA que atuam em cis, geralmente de aproximadamente 10 até aproximadamente 300 pb de comprimento que atuam sobre um promotor para aumentar a sua transcrição. Os exemplos incluem o intensificador do SV40 do lado tardio das 100 até 270 pb da origem de replicação, o intensificador do promotor inicial de citomegalovírus, o intensificador de políoma do lado tardio da origem de replicação e os intensificadores de adenovírus.

[00336] Em adição, os vetores de expressão contêm tipicamente um ou mais genes marcadores que podem ser selecionados para permitir a seleção de células hospedeiras que contêm o vetor. Tais marcadores que podem ser selecionados incluem genes que codificam di-hidrofolato redutase ou genes que conferem resistência à neomicina para a cultura de células eucarióticas, genes que conferem resistência à tetraciclina ou à ampicilina em *E. coli* e o gene TRP1 de *S. cerevisiae*.

[00337] O DNA da sonda utilizado para isolar seletivamente o DNA alvo de interesse do DNA derivado de pelo menos um micro-organismo

pode ser uma sequência de região codificadora de comprimento completo ou uma sequência de região codificadora parcial de DNA de uma enzima de atividade conhecida. A biblioteca de DNA original pode ser submetida à sonda utilizando misturas de sondas que compreendem pelo menos uma parte da sequência de DNA que codifica uma enzima que possui a atividade enzimática especificada. Estas sondas ou bibliotecas de sondas podem ser de fita simples e o DNA microbiano que é submetido à sonda pode ser convertido para a forma de fita simples. As sondas que são adequadas são aquelas derivadas do DNA que codifica enzimas que possuem uma atividade similar ou idêntica à atividade enzimática especificada que será verificada.

[00338] O DNA da sonda pode ter pelo menos aproximadamente 10 bases ou pelo menos 15 bases. Em um aspecto, a região codificadora inteira pode ser empregada como uma sonda. As condições para a hibridização em que o DNA alvo é isolado de forma seletiva através do uso de pelo menos uma sonda de DNA serão planejadas para fornecer uma estringência de hibridização de pelo menos aproximadamente 50% de identidade de sequência, mais particularmente uma estringência que fornece uma identidade de sequência de pelo menos aproximadamente 70%.

[00339] O DNA da sonda pode ser "marcado" com um parceiro de um par de ligação específica (isto é, um ligante) e o outro parceiro do par é ligado a uma matriz sólida para fornecer facilidade de separação do alvo de sua fonte. O ligante e o parceiro de ligação específica podem ser selecionados, em qualquer orientação, dos seguintes: (1) um antígeno ou um hapteno e um anticorpo ou fragmento de ligação específica do mesmo; (2) biotina ou iminobiotina e avidina ou estreptavidina; (3) um açúcar e uma lectina específica ao mesmo; (4) uma enzima e um inibidor para a mesma; (5) uma apoenzima e um cofator; (6) oligonucleotídeos homopoliméricos

complementares; e (7) um hormônio e um receptor para o mesmo. A fase sólida pode ser selecionada de: (1) um vidro ou uma superfície polimérica; (2) uma coluna compactada de esferas poliméricas; e (3) partículas magnéticas ou paramagnéticas.

[00340] A sequência de DNA apropriada pode ser inserida no vetor através de uma variedade de procedimentos. Em geral, a sequência de DNA é ligada na posição desejada no vetor após a digestão do inserto e do vetor com endonucleases de restrição apropriadas. Alternativamente, as pontas cegas tanto no inserto quanto no vetor podem ser ligadas. Uma variedade de técnicas de clonagem é divulgada em Ausubel e outros Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley 503 Sons, Inc. 1997 e Sambrook e outros, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Tais procedimentos e outros são considerados como estando dentro do âmbito dos versados na técnica.

[00341] O vetor pode estar, por exemplo, na forma de um plasmídeo, uma partícula viral ou um fago. Outros vetores incluem sequências de DNA cromossômicas, não cromossômicas e sintéticas, derivados de SV40; plasmídeos bacterianos, DNA de fago, baculovírus, plasmídeos de levedura, vetores derivados de combinações de plasmídeos e DNA de fago, DNA viral tal como vaccinia, adenovírus, fowl pox vírus e pseudorraiva. Uma variedade de vetores de clonagem e de expressão para uso com hospedeiros procarióticos e eucarióticos é descrita por Sambrook e outros, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edição, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989).

[00342] Os vetores bacterianos particulares que podem ser utilizados incluem os plasmídeos disponíveis comercialmente que compreendem elementos genéticos do vetor de clonagem pBR322 bem conhecido (ATCC

37017), pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suécia), GEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA) pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen), pD10, psiX174 pBluescript II KS, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A (Stratagene), ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia), pKK232-8 e pCM7. Os vetores eucarióticos particulares incluem pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG e pSVL (Pharmacia). Entretanto, qualquer outro vetor pode ser utilizado contanto que este possa ser replicado e que seja viável na célula hospedeira.

[00343] A célula hospedeira pode ser qualquer uma das células hospedeiras familiares aos versados na técnica, incluindo células procarióticas, células eucarióticas, células de mamífero, células de inseto ou células vegetais. Como exemplos representativos de hospedeiros apropriados, podem ser mencionados: células bacterianas, tais como *E. coli*, *Streptomyces*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* e várias espécies dentro dos gêneros *Pseudomonas*, *Streptomyces* e *Staphylococcus*, células fúngicas, tal como *Aspergillus*, levedura tal como quaisquer espécies de *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Schwanniomyces*, incluindo *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* ou *Schizosaccharomyces pombe*, células de inseto tais como *Drosophila* S2 e *Spodoptera* Sf9, células de animais tal como CHO, COS ou melanoma de Bowes e adenovírus. A seleção de um hospedeiro apropriado está dentro das capacidades dos versados na técnica.

[00344] O vetor pode ser introduzido nas células hospedeiras utilizando qualquer uma de uma variedade de técnicas, incluindo transformação, transfecção, transdução, infecção viral, pistolas gênicas e transferência gênica mediada por Ti. Os métodos particulares incluem transfecção com fosfato de cálcio, transfecção mediada por DEAE-

Dextrano, lipofecção ou eletroporação (Davis, L., Dibner, M., Battey, I., Basic Methods in Molecular Biology, (1986)).

[00345] Quando apropriado, as células hospedeiras engenheiradas podem ser cultivadas em meios nutricionais convencionais modificados como apropriado para a ativação de promotores, para a seleção de transformantes ou para a amplificação dos genes da invenção. Após a transformação de uma cepa hospedeira adequada e o cultivo da cepa hospedeira até uma densidade celular apropriada, o promotor selecionado pode ser induzido através de meios apropriados (por exemplo, modificação da temperatura ou indução química) e as células podem ser cultivadas durante um período adicional para permitir que estas produzam o polipeptídeo desejado ou um fragmento do mesmo.

[00346] As células são tipicamente coletadas através de centrifugação, rompidas através de meios físicos ou químicos e o extrato bruto resultante é mantido para purificação adicional. As células microbianas empregadas para a expressão de proteínas podem ser rompidas através de qualquer método conveniente, incluindo ciclos de congelamento-descongelamento, ultrassom, rompimento mecânico ou uso de agentes de lise celular. Tais métodos são bem conhecidos pelos versados na técnica. O polipeptídeo expresso ou um fragmento do mesmo pode ser recuperado e purificado partindo de culturas de células recombinantes através de métodos que incluem precipitação com sulfato de amônio ou etanol, extração ácida, cromatografia de troca aniônica ou catiônica, cromatografia em fosfocelulose, cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia por afinidade, cromatografia em hidroxilapatita e cromatografia em lectina. Podem ser utilizadas as etapas de redobramento das proteínas, quando necessário, para completar a configuração do polipeptídeo. Se desejado, a

cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) pode ser empregada para as etapas de purificação final.

[00347] Também podem ser empregados vários sistemas de cultura de células de mamífero para expressar a proteína recombinante. Os exemplos de sistemas de expressão de mamífero incluem as linhagens COS-7 de fibroblastos renais de macaco (descritas por Gluzman, *Cell*, 23:175, 1981) e outras linhagens de células capazes de expressar proteínas partindo de um vetor compatível, tais como as linhagens de células C127, 3T3, CHO, HeLa e BHK.

[00348] Os constructos nas células hospedeiras podem ser utilizados de uma maneira convencional para a obtenção do produto gênico codificado pela sequência recombinante. Dependendo do hospedeiro empregado em um procedimento de produção recombinante, os polipeptídeos produzidos pelas células hospedeiras que contêm o vetor podem ser glicosilados ou podem ser não glicosilados. Os polipeptídeos da invenção podem ou não também incluir um resíduo de aminoácido metionina inicial. Os detalhes adicionais em relação à expressão recombinante de proteínas estão disponíveis aos versados na técnica. Por exemplo, Protein Expression: A Practical Approach (Practical Approach Series por S. J. Higgins (Editor), B. D. Hames (Editor) (julho de 1999) Oxford University Press; ISBN: 0199636249 fornece uma orientação ampla para os versados na técnica para a expressão de proteínas em uma ampla variedade de organismos.

[00349] Alternativamente, os polipeptídeos da invenção podem ser produzidos de forma sintética através de sintetizadores de peptídeos convencionais. Em outros aspectos, fragmentos ou partes dos polipeptídeos podem ser empregadas para a produção do polipeptídeo de comprimento completo correspondente através da síntese de peptídeos; portanto, os

fragmentos podem ser empregados como intermediários para a produção dos polipeptídeos de comprimento completo.

[00350] Como é conhecido pelos versados na técnica, as sequências de ácidos nucleicos da invenção podem ser otimizadas para a expressão em uma variedade de organismos. Em um aspecto, as sequências da invenção são otimizadas em relação ao uso de códons em um organismo de interesse, por exemplo, um fungo tal como *S. cerevisiae* ou uma bactéria tal como *E. coli*. A otimização de sequências de ácidos nucleicos com a finalidade de uso de códons é bem entendida na técnica como se referindo à seleção de um códon particular favorito por um organismo para codificar um aminoácido particular. As tabelas de usos de códons otimizados são conhecidas para muitos organismos. Por exemplo, ver Transfer RNA in Protein Synthesis por Dolph L. Hatfield, Byeong J. Lee, Robert M. Pirtle (Editor) (julho de 1992) CRC Press; ISBN: 0849356989. Assim, a invenção inclui ainda os ácidos nucleicos da invenção adaptados para o uso de códons de um organismo.

[00351] A expressão otimizada de sequências de ácidos nucleicos da invenção também se refere à mutagênese direcionada ou aleatória de um ácido nucleico para realizar uma maior expressão da proteína codificada. A mutagênese dos ácidos nucleicos da invenção pode fornecer diretamente ou indiretamente um maior rendimento de proteína expressa. Com a finalidade de exemplo não-limitante, as técnicas de mutagênese descritas aqui podem ser utilizadas para realizar a mutação da região não-traduzida 5', da região não-traduzida 3' ou da região codificadora de um ácido nucleico, cuja mutação pode resultar em uma maior estabilidade no nível de RNA ou de proteína, resultando assim em um maior rendimento de proteína.

[00352] Os sistemas de tradução isentos de células também podem ser empregados para a produção de um dos polipeptídeos da invenção,

utilizando mRNAs transcritos partindo de uma construção de DNA que compreende um promotor ligado de forma operacional a um ácido nucleico que codifica o polipeptídeo ou um fragmento do mesmo. Em alguns aspectos, o constructo de DNA pode ser linearizado antes da realização de uma reação de transcrição in vitro. O mRNA transcrito é então incubado com um extrato de tradução isento de células apropriado, tal como um extrato de reticulócitos de coelho, para a produção do polipeptídeo desejado ou de um fragmento do mesmo.

[00353] A invenção refere-se ainda a variações dos polipeptídeos da invenção. O termo "variação" inclui derivados ou análogos destes polipeptídeos. Em particular, as variações podem diferir em relação à sequência de aminoácidos dos polipeptídeos da invenção e sequências substancialmente idênticas à mesma, por uma ou mais substituições, adições, deleções, fusões e truncamentos, que podem estar presentes em qualquer combinação.

[00354] As variações podem ser as que ocorrem naturalmente ou as criadas in vitro. Em particular, tais variações podem ser criadas utilizando técnicas de engenharia genética tais como mutagênese direcionada ao sítio, mutagênese química aleatória, procedimentos de deleção com Exonuclease III e técnicas de clonagem padronizadas. Alternativamente, tais variações, fragmentos, análogos ou derivados podem ser criados utilizando procedimentos de síntese ou de modificação química.

[00355] Outros métodos de produção de variações são também familiares aos versados na técnica. Estes incluem procedimentos em que sequências de ácidos nucleicos obtidas de isolados naturais são modificadas para gerar ácidos nucleicos que codificam polipeptídeos que possuem características que aumentam seu valor em aplicações industriais ou de

laboratório. Em tais procedimentos, é gerado e caracterizado um grande número de sequências variantes que possuem uma ou mais diferenças de nucleotídeos em relação à sequência obtida do isolado natural. Tipicamente, estas diferenças de nucleotídeos resultam em alterações de aminoácidos em relação aos polipeptídeos codificados pelos ácidos nucleicos provenientes dos isolados naturais.

[00356] Por exemplo, as variações podem ser criadas utilizando PCR propensa a erros. Na PCR propensa a erros, a PCR é realizada sob condições em que a fidelidade de cópia da DNA polimerase é baixa, de forma que uma taxa alta de mutações pontuais é obtida ao longo do comprimento inteiro do produto da PCR. A PCR propensa a erros é descrita em Leung, D.W. e outros, *Technique*, 1:11-15, 1989) e Caldwell, R. C. e Joyce G.F., *PCR Methods Applic.*, 2:28-33, 1992. Sucintamente, em tais procedimentos, os ácidos nucleicos que serão submetidos à mutagênese são misturados com iniciadores da PCR, tampão de reação, MgCl₂, MnCl₂, Taq polimerase e uma concentração apropriada de dNTPs para atingir uma taxa alta de mutação pontual ao longo do comprimento inteiro do produto da PCR. Por exemplo, a reação pode ser realizada utilizando 20 fmols do ácido nucleico que será submetido à mutagênese, 30 pmols de cada iniciador da PCR, um tampão de reação que compreende 50 mM de KCl, 10 mM de Tris HCl (pH 8,3) e 0,01% de gelatina, 7 mM de MgCl₂, 0,5 mM de MnCl₂, 5 unidades de Taq polimerase, 0,2 mM de dGTP, 0,2 mM de dATP, 1 mM de dCTP e 1 mM de dTTP. A PCR pode ser realizada durante 30 ciclos de 94° C durante 1 min, 45° C durante 1 min e 72° C durante 1 min. Entretanto, será considerado que estes parâmetros podem ser variados quando apropriado. Os ácidos nucleicos que sofreram mutagênese são clonados em um vetor apropriado e as atividades dos polipeptídeos codificados pelos ácidos

nucleicos que sofreram mutagênese são avaliadas.

[00357] As variações também podem ser criadas utilizando mutagênese direcionada por oligonucleotídeo para gerar mutações específicas ao sítio em qualquer DNA de interesse clonado. A mutagênese com oligonucleotídeos é descrita em Reidhaar-Olson, J.F. e Sauer, R.T. e outros, Science, 241:53-57, 1988. Sucintamente, em tais procedimentos um grande número de oligonucleotídeos de fita dupla carregando uma ou mais mutações que serão introduzidas no DNA clonado é sintetizado e inserido no DNA clonado que sofrerá mutagênese. Os clones que contêm o DNA que sofreu mutagênese são recuperados e as atividades dos polipeptídeos que codificam são avaliadas.

[00358] Um outro método para gerar variações é a PCR de montagem. A PCR de montagem envolve a montagem de um produto da PCR proveniente de uma mistura de fragmentos de DNA pequenos. Um grande número de reações de PCR diferentes ocorre em paralelo no mesmo frasco, com os produtos de uma reação iniciando os produtos de uma outra reação. A PCR de montagem é descrita no Pedido de Patente U.S. pendente No de Série 08/677.112 depositado em 9 de julho de 1996, intitulado, Method of "DNA Shuffling with Polynucleotides Produced by Blocking or interrupting a Synthesis or Amplification Process".

[00359] Ainda um outro método de gerar variações é a mutagênese por PCR sexual. Na mutagênese por PCR sexual, a recombinação homóloga forçada ocorre entre moléculas de DNA de sequências de DNA diferentes, mas altamente relacionadas, in vitro como um resultado da fragmentação aleatória da molécula de DNA com base na homologia de sequência, seguida pela fixação do "cross-over" através da extensão dos iniciadores em uma reação de PCR. A mutagênese por PCR sexual é descrita em Stemmer, W.P.,

PNAS, USA, 91:10747-10751, 1994. Sucintamente, em tais procedimentos um grande número de ácidos nucleicos que será recombinado é digerido com DNase para gerar fragmentos que possuem um tamanho médio de 50-200 nucleotídeos. Os fragmentos do tamanho médio desejado são purificados e ressuspensos em uma mistura de PCR. A PCR é realizada sob condições que facilitam a recombinação entre os fragmentos de ácidos nucleicos. Por exemplo, a PCR pode ser realizada através da ressuspensão dos fragmentos purificados em uma concentração de 10-30 ng/ μ L em uma solução de 0,2 mM de cada dNTP, 2,2 mM de MgCl₂, 50 mM de KCL, 10 mM de Tris HCl, pH 9,0 e 0,1% de Triton X-100. 2,5 unidades de Taq polimerase por 100 μ L de mistura de reação são adicionadas e a PCR é realizada utilizando o regime a seguir: 94° C durante 60 segundos, 94° C durante 30 segundos, 50-55° C durante 30 segundos, 72° C durante 30 segundos (30-45 vezes) e 72° C durante 5 minutos. Entretanto, será considerado que estes parâmetros podem ser variados quando apropriado. Em alguns aspectos, os oligonucleotídeos podem ser incluídos nas reações de PCR. Em outros aspectos, o fragmento de Klenow da DNA polimerase I pode ser utilizado em um primeiro conjunto de reações de PCR e a Taq polimerase pode ser utilizada em um conjunto subsequente de reações de PCR. As sequências recombinantes são isoladas e as atividades dos polipeptídeos que codificam são avaliadas.

[00360] As variações também podem ser criadas através da mutagênese in vivo. Em alguns aspectos, as mutações aleatórias em uma sequência de interesse são geradas através da propagação da sequência de interesse em uma cepa bacteriana, tal como uma cepa de E. coli, que carrega mutações em uma ou mais das vias de reparo de DNA. Tais cepas "causadoras de mutação" possuem uma taxa de mutação aleatória maior que

a de um parental do tipo selvagem. A propagação do DNA em uma destas cepas gerará conseqüentemente mutações aleatórias dentro do DNA. As cepas causadoras de mutação adequadas para uso para a mutagênese in vivo são descritas na Publicação PCT No WO 91/16427, publicada em 31 de outubro de 1991, intitulada "Methods for Phenotype Creation from Multiple Gene Populations".

[00361] As variações também podem ser geradas utilizando mutagênese por cassete. Na mutagênese por cassete, uma pequena região de uma molécula de DNA de fita dupla é substituída por um "cassete" de oligonucleotídeo sintético que difere da sequência nativa. O oligonucleotídeo contém frequentemente sequência nativa completamente e/ou parcialmente aleatória.

[00362] A mutagênese de conjunto recursivo também pode ser utilizada para gerar variações. A mutagênese de conjunto recursivo é um algoritmo para a engenharia de proteínas (mutagênese de proteínas) desenvolvido para produzir populações distintas de mutantes relacionados fenotipicamente cujos membros diferem em relação à sequência de aminoácidos. Este método utiliza um mecanismo de retroalimentação para controlar rodadas sucessivas de mutagênese por cassete combinatório. A mutagênese de conjunto recursivo é descrita em Arkin, A.P. e Youvan, D.C., PNAS, USA, 89:7811-7815, 1992.

[00363] Em alguns aspectos, as variações são criadas utilizando mutagênese de conjunto exponencial. A mutagênese de conjunto exponencial é um processo para gerar bibliotecas combinatórias com uma alta porcentagem de mutantes únicos e funcionais, em que grupos pequenos de resíduos são selecionados de forma aleatória em paralelo para a identificação, em cada posição alterada, de aminoácidos que levam a

proteínas funcionais. A mutagênese de conjunto exponencial é descrita em Delegrave, S. e Youvan, D.C., *Biotechnol. Res.*, 11:1548-1552, 1993. As mutagêneses aleatória e direcionada ao sítio são descritas em Arnold, F.H., *Current Opinion in Biotechnology*, 4:450-455, 1993.

[00364] Em alguns aspectos, as variações são criadas utilizando procedimentos de embaralhamento em que partes de um grande número de ácidos nucleicos que codificam polipeptídeos distintos são fundidas juntas para criar sequências de ácidos nucleicos quiméricas que codificam polipeptídeos quiméricos como descrito no Pedido de Patente U.S. pendente Nº de Série 08/677.112 depositado em 9 de julho de 1996, intitulado, "Method of DNA Shuffling with Polynucleotides Produced by Blocking or interrupting a Synthesis or Amplification Process" e no Pedido de Patente U.S. pendente Nº de Série 08/651.568 depositado em 22 de maio de 1996, intitulado, "Combinatorial Enzyme Development".

[00365] As variações dos polipeptídeos da invenção podem ser variações em que um ou mais dos resíduos de aminoácidos dos polipeptídeos da invenção são substituídos por um resíduo de aminoácido conservado ou não-conservado (por exemplo, um resíduo de aminoácido conservado) e tal resíduo de aminoácido substituído pode ou não ser um codificado pelo código genético.

[00366] As substituições conservativas são aquelas que substituem um certo aminoácido em um polipeptídeo com um outro aminoácido de características similares. Tipicamente observadas como substituições conservativas são as substituições a seguir: substituições de um aminoácido alifático tal como Ala, Val, Leu e Ile com um outro aminoácido alifático; substituição de uma Ser com uma Thr ou vice-versa; substituição de um resíduo ácido tal como Asp e Glu com um outro resíduo ácido; substituição

de um resíduo que carrega um grupo amida, tal como Asn e Gln, com um outro resíduo que carrega um grupo amida; troca de um resíduo básico tal como Lys e Arg por um outro resíduo básico; e substituição de um resíduo aromático tal como Phe, Tyr com um outro resíduo aromático.

[00367] Outras variações são aquelas em que um ou mais dos resíduos de aminoácidos dos polipeptídeos da invenção incluem um grupo substituinte.

[00368] Ainda outras variações são aquelas em que o polipeptídeo está associado com um outro composto, tal como um composto para aumentar a meia vida do polipeptídeo (por exemplo, polietileno glicol).

[00369] Variações adicionais são aquelas em que aminoácidos adicionais são fundidos ao polipeptídeo, tal como uma sequência líder, uma sequência secretora, uma sequência de pró-proteína ou uma sequência que facilita a purificação, o enriquecimento ou a estabilização do polipeptídeo. Em alguns aspectos, os derivados e os análogos mantêm a mesma função ou atividade biológica que os polipeptídeos da invenção e podem incluir uma pró-proteína, de forma que o fragmento, o derivado ou o análogo pode ser ativado através da clivagem da parte de pró-proteína para produzir um polipeptídeo ativo.

Otimização de códons para atingir altos níveis de expressão de proteína nas células hospedeiras

[00370] A invenção fornece métodos para a modificação de ácidos nucleicos que codificam fitase para modificar o uso de códons. Em um aspecto, a invenção fornece métodos para a modificação de códons em um ácido nucleico que codifica uma fitase para aumentar ou para diminuir a sua expressão em uma célula hospedeira. A invenção fornece ainda ácidos nucleicos que codificam uma fitase modificada para aumentar a sua

expressão em uma célula hospedeira, enzimas fitases modificadas dessa maneira e métodos de produção das enzimas fitases modificadas. O método compreende a identificação de um códon "não-preferido" ou "menos preferido" no ácido nucleico que codifica fitase e a substituição de um ou mais destes códons não-preferidos ou menos preferidos com um "códon preferido" que codifica o mesmo aminoácido que o códon substituído e pelo menos um códon não-preferido ou menos preferido no ácido nucleico foi substituído por um códon preferido que codifica o mesmo aminoácido. Um códon preferido é um códon super-representado nas sequências codificadoras nos genes na célula hospedeira e um códon não-preferido ou menos preferido é um códon subrepresentado nas sequências codificadoras nos genes na célula hospedeira.

[00371] As células hospedeiras para a expressão dos ácidos nucleicos, cassetes de expressão e vetores da invenção incluem bactérias, levedura, fungos, células vegetais, células de inseto e células de mamífero. Assim, a invenção fornece métodos para a otimização do uso de códons em todas estas células, ácidos nucleicos com códons alterados e polipeptídeos produzidos pelos ácidos nucleicos com códons alterados. Os exemplos de células hospedeiras incluem bactérias gram negativas, tais como *Escherichia coli* e *Pseudomonas fluorescens*; bactérias gram positivas, tais como *Lactobacillus gasseri*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*, *Bacillus subtilis*. Os exemplos de células hospedeiras incluem ainda organismos eucarióticos, por exemplo, várias leveduras, tais como *Saccharomyces* sp., incluindo *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris* e *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, *Aspergillus niger* e células e linhagens de células de mamífero e células e linhagens de células de inseto. Assim, a invenção inclui ainda ácidos nucleicos e polipeptídeos

otimizados em relação à expressão nestes organismos e espécies.

[00372] Por exemplo, os códons de um ácido nucleico que codifica uma fitase isolada de uma célula bacteriana são modificados de forma que o ácido nucleico é expresso de forma ótima em uma célula bacteriana diferente das bactérias das quais a fitase foi derivada, uma levedura, um fungo, uma célula vegetal, uma célula de inseto ou uma célula de mamífero. Os métodos para a otimização de códons são bem conhecidas na técnica, ver, por exemplo, a Patente U.S. Nº 5.795.737; Baca (2000) *Int. J. Parasitol.* 30:113-118; Hale (1998) *Protein Expr. Purif.* 12:185-188; Narum (2001) *Infect. Immun.* 69:7250-7253. Ver também Narum (2001) *Infect. Immun.* 69:7250-7253, que descreve a otimização de códons em sistemas de camundongos; Outchkourov (2002) *Protein Expr. Purif.* 24:18-24, que descreve a otimização de códons em levedura; Feng (2000) *Biochemistry* 39:15399-15409, que descreve a otimização de códons em *E. coli*; Humphreys (2000) *Protein Expr. Purif.* 20:252-264, que descreve a otimização do uso de códons que afeta a secreção em *E. coli*.

Animais não-humanos transgênicos

[00373] A invenção fornece animais não-humanos transgênicos que compreendem um ácido nucleico, um polipeptídeo, um cassete de expressão ou um vetor ou uma célula transfectada ou transformada da invenção. Os animais não-humanos transgênicos podem ser, por exemplo, cabras, coelhos, ovelhas, porcos, vacas, ratos e camundongos, que compreendem os ácidos nucleicos da invenção. Estes animais podem ser utilizados, por exemplo, como modelos *in vivo* para estudar a atividade da fitase ou, como modelos para selecionar moduladores da atividade da fitase *in vivo*. As sequências codificadoras dos polipeptídeos que serão expressos nos animais não-humanos transgênicos podem ser planejadas para serem constitutivas ou,

estarem sob o controle de fatores reguladores da transcrição específicos ao tecido, específicos ao desenvolvimento ou que podem ser induzidos. Os animais não-humanos transgênicos podem ser planejados e gerados utilizando qualquer método conhecido na técnica; ver, por exemplo, as Patentes U.S. Nos 6.211.428; 6.187.992; 6.156.952; 6.118.044; 6.111.166; 6.107.541; 5.959.171; 5.922.854; 5.892.070; 5.880.327; 5.891.698; 5.639.940; 5.573.933; 5.387.742; 5.087.571, que descrevem a produção e a utilização de células e óvulos transformados e camundongos, ratos, coelhos, ovelhas, porcos e vacas transgênicos. Ver também, por exemplo, Pollock (1999) J. Immunol. Methods 231:147-157, que descreve a produção de proteínas recombinantes no leite de animais leiteiros transgênicos; Baguisi (1999) Nat. Biotechnol. 17:456-461, que demonstra a produção de cabras transgênicas. A Patente U.S. No 6.211.428, descreve a produção e a utilização de mamíferos não-humanos transgênicos que expressam em seus cérebros um constructo de ácido nucleico que compreende uma sequência de DNA. A Patente U.S. No 5.387.742, descreve a injeção de sequências de DNA recombinantes ou sintéticas clonadas em óvulos de camundongo fertilizados, a implantação dos óvulos injetados em fêmeas pseudoprenhes e o crescimento até o termo de camundongos transgênicos cujas células expressam proteínas relacionadas com a patologia da doença de Alzheimer. A Patente U.S. No 6.187.992, descreve a produção e a utilização de um camundongo transgênico cujo genoma compreende uma interrupção do gene que codifica a proteína precursora amilóide (APP).

[00374] "Animais knockout" também podem ser utilizados na prática dos métodos da invenção. Por exemplo, em um aspecto, os animais transgênicos ou modificados da invenção compreendem um "animal knockout", por exemplo, um "camundongo knockout", engenheirado para

não expressar ou para ser incapaz de expressar uma fitase.

[00375] Em um outro aspecto, são fornecidos organismos não-humanos transgênicos que contêm uma sequência heteróloga que codifica uma fitase da invenção (por exemplo, as modificações de sequência especificamente enumeradas da SEQ ID NO: 2). Podem ser empregados vários métodos para a produção de animais transgênicos da presente invenção. Falando de forma geral, três tais métodos podem ser empregados. Em um tal método, um embrião no estágio pró-nuclear (um "embrião de uma célula") é coletado de uma fêmea e o transgene é microinjetado no embrião, em cujo caso o transgene será integrado de forma cromossômica tanto nas células germinativas quanto nas células somáticas do animal maduro resultante. Em um outro tal método, as células do tronco embrionário são isoladas e o transgene é incorporado ali por eletroporação, transfecção de plasmídeo ou microinjeção, seguida pela reintrodução das células do caule no embrião onde colonizam e contribuem para a linhagem germinativa. Os métodos para microinjeção de espécies de mamíferos são descritos na Patente U.S. Nº 4.873.191.

[00376] Ainda em outro exemplo de método, as células embrionárias são infectadas com um retrovírus que contém o transgene através do qual as células germinativas do embrião possuem o transgene integrado de forma cromossômica nas mesmas. Quando os animais que serão tornados transgênicos são aves, devido ao fato de que os óvulos fertilizados de aves geralmente sofrem divisão celular durante as primeiras vinte horas no oviduto, a microinjeção no pró-núcleo do óvulo fertilizado é problemática por causa da inacessibilidade do pró-núcleo. Portanto, dos métodos para produzir animais transgênicos descritos de forma geral anteriormente, a infecção com retrovírus é preferida para espécies de aves, por exemplo,

como descrito na Patente U.S. No 5.162.215. Se a microinjeção tiver que ser utilizada com espécies de aves, entretanto, pode ser utilizado um procedimento publicado por Love e outros, (Biotechnol., 12, janeiro de 1994) em que o embrião é obtido de uma fêmea de ave sacrificada aproximadamente duas horas e meia após a postura do ovo colocado anterior, o transgene é microinjetado no citoplasma do disco germinal e o embrião é cultivado na casca hospedeira até a maturidade. Quando os animais que serão tornados transgênicos são bovinos ou suínos, a microinjeção pode ser dificultada pela opacidade dos óvulos tornando assim os núcleos difíceis de serem identificados através da microscopia de contraste por interferência diferencial tradicional. Para superar este problema, os óvulos podem ser primeiramente centrifugados para segregar os pró-núcleos para uma visualização melhor.

[00377] Em um aspecto, os "animais não-humanos" da invenção incluem animais bovinos, suínos, ovinos e aves (por exemplo, vaca, porco, ovelha, galinha). Os "animais não-humanos transgênicos" da invenção são produzidos através da introdução de "transgenes" na linhagem germinativa do animal não-humano. As células embrionárias alvo em vários estágios do desenvolvimento podem ser utilizadas para a introdução dos transgenes. Métodos diferentes são utilizados dependendo do estágio do desenvolvimento da célula embrionária alvo. O zigoto é o melhor alvo para a microinjeção. O uso de zigotos como alvo para a transferência gênica possui uma vantagem principal no fato de que na maioria dos casos o DNA injetado será incorporado no gene hospedeiro antes da primeira clivagem (Brinster e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4438-4442, 1985). Como uma consequência, todas as células do animal não-humano transgênico carregarão o transgene incorporado. Isto também será em geral refletido na

transmissão eficiente do transgene para a prole do fundador uma vez que 50% das células germinativas carregarão o transgene.

[00378] Em um aspecto, o termo "transgênico" é utilizado para descrever um animal que inclui material genético exógeno dentro de todas as suas células. Um animal "transgênico" pode ser produzido através do cruzamento de dois animais quiméricos que incluem material genético exógeno dentro das células utilizadas na reprodução. Vinte e cinco por cento da prole resultante será transgênica, isto é, os animais que incluem o material genético exógeno dentro de todas as suas células em ambos os alelos, 50% dos animais resultantes incluirão o material genético exógeno dentro de um alelo e 25% não incluirão material genético exógeno.

[00379] Em um aspecto, um método de microinjeção é utilizado na prática da invenção. O transgene é digerido e purificado livre de qualquer DNA de vetor, por exemplo, por eletroforese em gel. Em um aspecto, o transgene inclui um promotor associado de forma operacional que interage com proteínas celulares envolvidas na transcrição, resultando em última análise na expressão constitutiva. Os promotores úteis sob este aspecto incluem aqueles do citomegalovírus (CMV), do vírus da leucemia de Moloney (MLV) e do vírus da herpes, assim como aqueles dos genes que codificam metalotionina, actina esquelética, P-enolpiruvato carboxilase (PEPCK), fosfoglicerato (PGK), DHFR e timidina quinase. Os promotores para repetições terminais longas virais (LTRs) tais como do Vírus do Sarcoma de Rous também podem ser empregados. Quando os animais que serão tornados transgênicos são aves, os promotores preferidos podem incluir aqueles para o gene da β -globina do frango, o gene da lisozima do frango e do vírus da leucose de aves. Os constructos úteis na transfecção com plasmídeos de células do tronco embrionário empregarão elementos

reguladores adicionais bem conhecidos na técnica tais como elementos intensificadores para estimular a transcrição, receptores de processamento, sinais de término e de poliadenilação e sítios de ligação de ribossomos para permitir a tradução.

[00380] A infecção com retrovírus também pode ser utilizada para introduzir um transgene em um animal não-humano, como descrito anteriormente. O embrião não-humano em desenvolvimento pode ser cultivado in vitro até o estágio de blastocisto. Durante este período de tempo, os blastômeros podem ser alvos para a infecção por retrovírus (Jaenich, R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:1260-1264, 1976). A infecção eficiente dos blastômeros é obtida através do tratamento enzimático para remover a zona pelúcida (Hogan e outros (1986) em Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). O sistema de vetor viral utilizado para a introdução do transgene é tipicamente um retrovírus defeituoso em relação à replicação que carrega o transgene (Jahner e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6927-6931, 1985; Van der Putten e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6148-6152, 1985). A transfecção é facilmente e eficientemente obtida através do cultivo dos blastômeros sobre uma monocamada de células produtoras de vírus (Van der Putten, supra; Stewart e outros, EMBO J. 6: 383-388, 1987). Alternativamente, a infecção pode ser realizada em um estágio tardio. O vírus ou as células produtoras de vírus podem ser injetadas no blastocelo (D. Jahner e outros, Nature 298: 623-628, 1982). A maior parte dos fundadores será um mosaico em relação ao transgene uma vez que a incorporação ocorre apenas em um subconjunto das células que formaram o animal não-humano transgênico. Ainda, o fundador pode conter várias inserções retrovirais do transgene em posições diferentes no genoma que geralmente

se segregarão na prole. Em adição, é também possível introduzir transgenes na linhagem germinativa, embora com baixa eficiência, através da infecção retroviral intrauterina do embrião na metade da gestação (D. Jahner e outros, *supra*).

[00381] Um terceiro tipo de célula alvo para a introdução do transgene é a célula do tronco embrionário (ES). As células do ES são obtidas partindo de embriões pré-implantação cultivados *in vitro* e fundidas com embriões (M. J. Evans e outros, *Nature* 292:154-156, 1981; M. O. Bradley e outros, *Nature* 309:255-258, 1984; Gossler e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:9065-9069, 1986; e Robertson e outros, *Nature* 322:445-448, 1986). Os transgenes podem ser eficientemente introduzidos nas células do ES através da transfecção do DNA ou através da transdução mediada por retrovírus. Tais células do ES transformadas podem, depois disso, ser combinadas com blastocistos provenientes de um animal não-humano. As células do ES, depois disso, colonizam o embrião e contribuem para a linhagem germinativa do animal quimérico resultante. (Para revisão, ver Jaenisch, R., *Science* 240:1468-1474, 1988).

[00382] Em um aspecto, "transformada" significa uma célula na qual (ou em cujo ancestral) foi introduzida, através de técnicas de ácidos nucleicos recombinantes, uma molécula de ácido nucleico heteróloga. "Heteróloga" refere-se a uma sequência de ácido nucleico que se origina de uma outra espécie ou é modificada partindo de sua forma original ou da forma primariamente expressa na célula.

[00383] Em um aspecto, o "transgene" significa qualquer pedaço de DNA que é inserido através de um artifício em uma célula e se torna parte do genoma do organismo (isto é, fica integrado de forma estável ou fica na forma de um elemento extracromossômico estável) que se desenvolve

partindo de tal células. Tal transgene pode incluir um gene que é parcialmente ou totalmente heterólogo (isto é, estranho) ao organismo transgênico ou pode representar um gene homólogo a um gene endógeno do organismo. Está incluído dentro desta definição um transgene criado através do fornecimento de uma sequência de RNA que é transcrita em DNA e então incorporada no genoma. Os transgenes da invenção incluem sequências de DNA que codificam fitases ou polipeptídeos que possuem atividade de fitase e incluem polinucleotídeos, que podem ser expressos em um animal não-humano transgênico. O termo "transgenico" como utilizado aqui inclui adicionalmente qualquer organismo cujo genoma foi alterado através da manipulação in vitro do embrião inicial ou do óvulo fertilizado ou através de qualquer tecnologia transgênica para induzir um nocaute gênico específico. O termo "nocaute gênico" como utilizado aqui, refere-se à interrupção direcionada de um gene in vivo com a perda completa de função que foi conseguida através de qualquer tecnologia transgênica familiar aos versados na técnica. Em um aspecto, os animais transgênicos que possuem nocautes gênicos são aqueles em que o gene-alvo foi tornado não-funcional através de uma inserção direcionada no gene que deveria ser tornado não-funcional por recombinação homóloga.

[00384] Em um aspecto, o termo "transgênica" inclui qualquer tecnologia transgênica familiar aos versados na técnica que pode produzir um organismo que carrega um transgene introduzido ou um em que um gene endógeno foi tornado não-funcional ou "knocked out".

[00385] O transgene que será utilizado na prática da presente invenção é uma sequência de DNA que compreende uma sequência que codifica uma fitase ou um polipeptídeo que possui atividade de fitase. Em um aspecto, um polinucleotídeo que possui uma sequência que é apresentada

na SEQ ID NO: 1 ou uma sequência que codifica um polipeptídeo que possui uma sequência que é apresentada na SEQ ID NO: 2 é o transgene como o termo é definido aqui. Quando apropriado, as sequências de DNA que codificam proteínas que possuem atividade de fitase, mas que diferem em relação à sequência de ácido nucleico devido à degeneração do código genético, também podem ser utilizadas aqui, assim como podem as formas truncadas, as variações alélicas e os homólogos interespecies.

[00386] Em um aspecto, após um embrião ter sofrido microinjeção, ser colonizado com células do tronco embrionário transfectadas ou ser infectado com um retrovírus contendo o transgene (exceto para a prática da presente invenção em espécies de aves que é indicada em outro local aqui), o embrião é implantado dentro do oviduto de uma fêmea pseudoprenhe. A progênie consequente é testada em relação à incorporação do transgene através da análise de Southern blot de amostras de sangue ou de tecido utilizando sondas específicas ao transgene. A PCR é particularmente útil nesse aspecto. A progênie positiva (G0) é cruzada para produzir a prole (G1) que é analisada em relação à expressão do transgene através da análise de Northern blot de amostras de tecido.

[00387] Em um aspecto, os métodos compreendem o aumento da ingestão de fósforo no animal transgênico e/ou a diminuição da quantidade de poluente no estrume do organismo transgênico em aproximadamente 15%, aproximadamente 20% ou aproximadamente 20%, até aproximadamente 50% ou mais.

[00388] Em um aspecto, os animais considerados para uso na prática da presente invenção são os animais geralmente considerados como animais domesticados incluindo animais de companhia (por exemplo, caninos, felinos, espécies de aves etc.) e aqueles úteis para o processamento de

matérias alimentícias, isto é, aves tais como frango criado para produção de carne e galinhas de postura de postura de ovos e peru, ovinos tal como cabrito, bovinos tais como gado de corte e vacas leiteiras, peixes e suínos. Em um aspecto, estes animais são referidos como "transgênicos" quando tal animal teve uma sequência de DNA heteróloga ou uma ou mais sequências de DNA adicionais normalmente endógenas ao animal (coletivamente referidas aqui como "transgenes") integradas de forma cromossômica nas células germinativas do animal. O animal transgênico (incluindo sua progênie) também terá o transgene casualmente integrado nos cromossomos de células somáticas.

Metodologias de Classificação e Dispositivos de Monitoramento "Online"

[00389] Na prática dos métodos da invenção, pode ser utilizada uma variedade de aparatos e metodologias em associação aos polipeptídeos e os ácidos nucleicos da invenção, por exemplo, para verificar os polipeptídeos em relação à atividade de fitase, para verificar compostos como modeladores potenciais de atividade (por exemplo, aumento da capacidade ou inibição da atividade enzimática), em relação a anticorpos que se ligam a um polipeptídeo da invenção, em relação a ácidos nucleicos que se hibridizam com um ácido nucleico da invenção e similares.

Suportes Sólidos com Enzima Imobilizada

[00390] As enzimas fitases, fragmentos das mesmas e os ácidos nucleicos que codificam as enzimas e os fragmentos podem ser fixados em um suporte sólido. Isto é frequentemente econômico e eficiente no uso das fitases em processos industriais. Por exemplo, uma associação ou um coquetel de enzimas fitases (ou fragmentos ativos das mesmas), que são utilizadas em uma reação química específica, pode ser ligado a um suporte sólido e imerso em um tanque de processo. A reação enzimática pode

ocorrer. Então, o suporte sólido pode ser tirado do tanque, junto com as enzimas fixadas no mesmo, para uso repetido. Em uma modalidade da invenção, um ácido nucleico isolado da invenção é fixado em um suporte sólido. Em uma outra modalidade da invenção, o suporte sólido é selecionado do grupo de um gel, uma resina, um polímero, uma cerâmica, um vidro, um microeletrodo e qualquer combinação dos mesmos.

[00391] Por exemplo, os suportes sólidos úteis nesta invenção incluem géis. Alguns exemplos de géis incluem Sepharose, gelatina, glutaraldeído, glutaraldeído tratado com quitosana, albumina-glutaraldeído, quitosana-Xantana, gel toyopearl (gel polimérico), alginato, alginato-polilisina, carragenana, agarose, glioxil agarose, agarose magnética, dextran-agarose, hidrogel de poli(Sulfonato de Carbamoila), hidrogel de BSA-PEG, álcool polivinílico fosforilado (PVA), monoaminoetil-N-aminoetila (MANA), amino ou qualquer combinação dos mesmos.

[00392] Outros suportes sólidos úteis na presente invenção são resinas ou polímeros. Alguns exemplos de resinas ou polímeros incluem celulose, acrilamida, náilon, raion, poliéster, resina de troca aninônica, AMBERLITE® XAD-7, AMBERLITE® XAD-8, AMBERLITE® IRA-94, AMBERLITE® IRC-50, polivinila, poliacrílico, polimetacrilato ou qualquer combinação dos mesmos. Um outro tipo de suporte sólido útil na presente invenção é a cerâmica. Alguns exemplos incluem cerâmica não-porosa, cerâmica porosa, SiO₂, Al₂O₃. Um outro tipo de suporte sólido útil na presente invenção é o vidro. Alguns exemplos incluem vidro não-poroso, vidro poroso, vidro de aminopropila ou qualquer combinação dos mesmos. Um outro tipo de suporte sólido que pode ser utilizado é um microeletrodo. Um exemplo é uma magnetita revestida com polietilenoimina. Partículas de grafite podem ser utilizadas como um suporte sólido. Um outro exemplo de

um suporte sólido é uma célula, tal como uma célula sanguínea vermelha.

Métodos de imobilização

[00393] Há muitos métodos que seriam conhecidos por um versado na técnica para a imobilização de enzimas ou de fragmentos das mesmas ou de ácidos nucleicos, sobre um suporte sólido. Alguns exemplos de tais métodos incluem, por exemplo, a geração de gotículas eletrostáticas, meios eletroquímicos, através de adsorção, através de ligação covalente, através de reticulação, através de uma reação ou um processo químico, através de encapsulamento, através de captura, através de alginato de cálcio ou através de poli (metacrilato de 2-hidroxietila). Métodos similares são descritos em *Methods in Enzymology, Immobilized Enzymes and Cells*, Parte C. 1987. Academic Press. Publicado por S. P. Colowick e N. O. Kaplan. Volume 136; e *Immobilization of Enzymes and Cells*. 1997. Humana Press. Publicado por G. F. Bickerstaff. Série: *Methods in Biotechnology*, Publicado por J. M. Walker.

Arranjos de capilares

[00394] Os arranjos de capilares, tal como o GIGAMATRIX™, Diversa Corporation, San Diego, CA, podem ser utilizados nos métodos da invenção. Os ácidos nucleicos ou os polipeptídeos da invenção podem ser imobilizados no ou aplicados a um arranjo, incluindo arranjos de capilares. Os arranjos podem ser utilizados para verificar em relação a ou monitorar bibliotecas de composições (por exemplo, moléculas pequenas, anticorpos, ácidos nucleicos etc.) em relação a sua capacidade de se ligar a ou de modular a atividade de um ácido nucleico ou de um polipeptídeo da invenção. Os arranjos de capilares fornecem um outro sistema para sustentar e verificar as amostras. Por exemplo, um aparelho de classificação de amostras pode incluir um grande número de capilares formados em um

arranjo de capilares adjacentes, em que cada capilar compreende pelo menos uma parede que define uma cavidade para reter uma amostra. O aparelho pode incluir ainda material intersticial disposto entre capilares adjacentes no arranjo e um ou mais indícios de referência formados dentro do material intersticial. Um capilar para a classificação de uma amostra, em que o capilar é adaptado para ser ligado em um arranjo de capilares, pode incluir uma primeira parede que define uma cavidade para reter a amostra e uma segunda parede formada de um material filtrante, para filtrar a energia de excitação fornecida para a cavidade para excitar a amostra.

[00395] Um polipeptídeo ou um ácido nucleico, por exemplo, um ligante, pode ser introduzido em um primeiro componente dentro de pelo menos uma parte de um capilar de um arranjo de capilares. Cada capilar do arranjo de capilares pode compreender pelo menos uma parede que define uma cavidade para reter o primeiro componente. Uma bolha de ar pode ser introduzida no capilar atrás do primeiro componente. Um segundo componente pode ser introduzido no capilar, onde o segundo componente é separado do primeiro componente pela bolha de ar. Uma amostra de interesse pode ser introduzida como um primeiro líquido marcado com uma partícula que pode ser detectada em um capilar de um arranjo de capilares, em que cada capilar do arranjo de capilares compreende pelo menos uma parede que define uma cavidade para reter o primeiro líquido e a partícula que pode ser detectada e em que a pelo menos uma parede é revestida com um material de ligação para a ligação da partícula que pode ser detectada a pelo menos uma parede. O método pode incluir ainda a remoção do primeiro líquido do tubo capilar, em que a partícula que pode ser detectada ligada é mantida dentro do capilar e a introdução de um segundo líquido no tubo capilar.

[00396] O arranjo de capilares pode incluir um grande número de capilares individuais que compreendem pelo menos uma parede externa que define uma cavidade. A parede externa do capilar pode ser uma ou mais paredes fundidas juntas. Similarmente, a parede pode definir uma cavidade que é cilíndrica, quadrada, hexagonal ou que possui qualquer outra forma geométrica contanto que as paredes formem uma cavidade para a retenção de um líquido ou de uma amostra. Os capilares do arranjo de capilares podem ser mantidos juntos em proximidade íntima para formar uma estrutura planar. Os capilares podem ser ligados juntos, sendo fundidos (por exemplo, em que os capilares são feitos de vidro), colados, ligados ou firmados lado a lado. O arranjo de capilares pode ser formado de qualquer número de capilares individuais, por exemplo, uma faixa de 100 até 4.000.000 capilares. Um arranjo de capilares pode formar uma placa de microtitulação que possuem aproximadamente 100.000 ou mais capilaridades individuais ligados juntos.

Arranjos ou "BioChips"

[00397] Os ácidos nucleicos ou os polipeptídeos da invenção podem ser imobilizados ou aplicados em um arranjo. Os arranjos podem ser utilizados para verificar ou monitorar bibliotecas de composições (por exemplo, moléculas pequenas, anticorpos, ácidos nucleicos etc.) em relação a sua capacidade de se ligar ou de modular a atividade de um ácido nucleico ou de um polipeptídeo da invenção. Por exemplo, em um aspecto da invenção, um parâmetro monitorado é a expressão do produto da transcrição de um gene de fitase. Um ou mais ou, todos os produtos da transcrição de uma célula podem ser medidos através da hibridização de uma amostra que compreende os produtos da transcrição da célula ou dos ácidos nucleicos representativos de ou complementares aos produtos da transcrição de uma

célula, através da hibridização com ácidos nucleicos imobilizados sobre um arranjo ou "biochip". Através da utilização de um "arranjo" de ácidos nucleicos ou um microchip, alguns ou todos os produtos da transcrição de uma célula podem ser simultaneamente quantificados. Alternativamente, os arranjos que compreendem ácido nucleico genômico também podem ser utilizados para determinar o genótipo de uma cepa recém engenheirada produzida através dos métodos da invenção. "Arranjos de polipeptídeos" também podem ser utilizados para quantificar simultaneamente um grande número de proteínas.

[00398] Em aspectos alternativos, "arranjos" ou "microarranjos" ou "biochips" ou "chips" da invenção compreendem um grande número de elementos-alvo em adição a um ácido nucleico e/ou um polipeptídeo ou um peptídeo da invenção; cada elemento-alvo pode compreender uma quantidade definida de um ou mais polipeptídeos (incluindo anticorpos) ou ácidos nucleicos imobilizados sobre uma área definida da superfície de um substrato, como discutido em detalhes adicionais, a seguir.

[00399] A presente invenção pode ser praticada com qualquer "arranjo" conhecido, também referido como um "microarranjo" ou um "arranjo de ácido nucleico" ou um "arranjo de polipeptídeo" ou um "arranjo de anticorpo" ou um "biochip" ou uma variação dos mesmos. Os arranjos são genericamente um grande número de "pontos" ou "elementos-alvo", cada elemento-alvo compreendendo uma quantidade definida de uma ou mais moléculas biológicas, por exemplo, oligonucleotídeos, imobilizados sobre uma área definida da superfície de um substrato para a ligação específica a uma molécula de amostra, por exemplo, produtos da transcrição de mRNA.

[00400] Na prática dos métodos da invenção, qualquer arranjo e/ou

método conhecido de produção e utilização de arranjos pode ser incorporado totalmente ou em parte ou variações do mesmo, como descrito, por exemplo, nas Patentes U.S. Nos 6.277.628; 6.277.489; 6.261.776; 6.258.606; 6.054.270; 6.048.695; 6.045.996; 6.022.963; 6.013.440; 5.965.452; 5.959.098; 5.856.174; 5.830.645; 5.770.456; 5.632.957; 5.556.752; 5.143.854; 5.807.522; 5.800.992; 5.744.305; 5.700.637; 5.556.752; 5.434.049; ver também, por exemplo, WO 99/51773; WO 99/09217; WO 97/46313; WO 96/17958; ver também, por exemplo, Johnston (1998) Curr. Biol. 8:R171-R174; Schummer (1997) Biotechniques 23:1087-1092; Kern (1997) Biotechniques 23:120-124; Solinas-Toldo (1997) Genes, Chromosomes & Cancer 20:399-407; Bowtell (1999) Nature Genetics Supp. 21:25-32. Ver também os Pedidos de Patentes U.S. publicados Nos 20010018642; 20010019827; 20010016322; 20010014449; 20010014448; 20010012537; 20010008765.

Polipeptídeos e peptídeos

[00401] A invenção fornece polipeptídeos isolados, sintéticos ou recombinantes que possuem uma sequência de aminoácidos com pelo menos 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência em relação a SEQ ID NO: 2 e codificados por um polinucleotídeo que compreende pelo menos uma, duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze, treze ou todas as quatorze modificações de sequências de pares de bases de nucleotídeos na SEQ ID NO: 1, descritas anteriormente e que possui uma sequência de aminoácidos que compreende pelo menos uma, duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze, treze ou todas as quatorze modificações de resíduos de aminoácidos específicas na SEQ ID NO: 2, descritas anteriormente. Para referência, a SEQ ID NO: 2 "original" gerada de forma sintética é:

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

	Pro Leu Phe Asn Pro Leu Lys Thr Gly Val Cys Gln Leu Asp												
Asn Ala													
	145	150			155			160					
	Asn Val Thr Asp Ala Ile Leu Glu Arg Ala Gly Gly Ser Ile												
Ala Asp													
	165	170			175								
	Phe Thr Gly His Tyr Gln Thr Ala Phe Arg Glu Leu Glu Arg												
Val Leu													
	180	185			190								
	Asn Phe Pro Gln Ser Asn Leu Cys Leu Lys Arg Glu Lys Gln												
Asp Glu													
	195	200			205								
	Ser Cys Ser Leu Thr Gln Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Val												
Ser Ala													
	210	215			220								
	Asp Cys Val Ser Leu Thr Gly Ala Val Ser Leu Ala Ser Met												
Leu Thr													
	225	230			235			240					
	Glu Ile Phe Leu Leu Gln Gln Ala Gln Gly Met Pro Glu Pro												
Gly Trp													
	245	250			255								
	Gly Arg Ile Thr Asp Ser His Gln Trp Asn Thr Leu Leu Ser												
Leu His													
	260	265			270								
	Asn Ala Gln Phe Asp Leu Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala												
Arg Ser													
	275	280			285								

	Arg	Ala	Thr	Pro	Leu	Leu	Asp	Leu	Ile	Lys	Thr	Ala	Leu	Thr
Pro His														
	290			295			300							
	Pro	Pro	Gln	Lys	Gln	Ala	Tyr	Gly	Val	Thr	Leu	Pro	Thr	Ser
Val Leu														
	305			310			315			320				
	Phe	Ile	Ala	Gly	His	Asp	Thr	Asn	Leu	Ala	Asn	Leu	Gly	Gly
Ala Leu														
	325			330			335							
	Glu	Leu	Asn	Trp	Thr	Leu	Pro	Gly	Gln	Pro	Asp	Asn	Thr	Pro
Pro Gly														
	340			345			350							
	Gly	Glu	Leu	Val	Phe	Glu	Arg	Trp	Arg	Arg	Leu	Ser	Asp	Asn
Ser Gln														
	355			360			365							
	Trp	Ile	Gln	Val	Ser	Leu	Val	Phe	Gln	Thr	Leu	Gln	Gln	Met
Arg Asp														
	370			375			380							
	Lys	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Asn	Thr	Pro	Pro	Gly	Glu	Val	Lys
Leu Thr														
	385			390			395			400				
	Leu	Ala	Gly	Cys	Glu	Glu	Arg	Asn	Ala	Gln	Gly	Met	Cys	Ser
Leu Ala														
	405			410			415							
	Gly	Phe	Thr	Gln	Ile	Val	Asn	Glu	Ala	Arg	Ile	Pro	Ala	Cys
Ser Leu														
	420			425			430							

A sequência da fitase parental SEQ ID NO: 2, codificada, por exemplo, pela SEQ ID NO: 1, que exhibe modificações de sequências geradas pela mutagênese por saturação no sítio gênico selecionadas para a construção da biblioteca GeneReassembly® é mostrada na Figura 8.

[00402] Em um aspecto, o polipeptídeo e os peptídeos da invenção possuem atividade de fitase. Em aspectos alternativos, também podem ser úteis, por exemplo, como sondas de marcação, antígenos, toleragens, motivos, sítios ativos da fitase.

[00403] Em aspectos alternativos, os polipeptídeos e os peptídeos da invenção são sintéticos ou são polipeptídeos gerados de forma recombinantes. Os peptídeos e as proteínas podem ser expressos de forma recombinante *in vitro* ou *in vivo*. Os peptídeos e os polipeptídeos da invenção também podem ser produzidos e isolados utilizando qualquer método conhecido na técnica. O polipeptídeo e os peptídeos da invenção também podem ser sintetizados, inteiros ou em parte, utilizando métodos químicos bem conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Caruthers (1980) *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.* 215-223; Horn (1980) *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.* 225-232; Banga, A.K., *Therapeutic Peptides and Proteins, Formulation, Processing and Delivery Systems* (1995) Technomic Publishing Co., Lancaster, PA. Por exemplo, a síntese de peptídeos pode ser realizada utilizando várias técnicas em fase sólida (ver, por exemplo, Roberge (1995) *Science* 269:202; Merrifield (1997) *Methods Enzymol.* 289:3-13) e a síntese automatizada pode ser conseguida, por exemplo, utilizando o ABI 431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer) de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

[00404] As enzimas e os polinucleotídeos da presente invenção podem ser fornecidos em uma forma isolada ou purificada até a

homogeneidade. O polipeptídeo de fitase da invenção pode ser obtido utilizando qualquer um dos vários métodos padronizados. Por exemplo, os polipeptídeos de fitase podem ser produzidos em um sistema de expressão recombinante padronizado (como descrito aqui), sintetizados quimicamente (embora de alguma maneira limitados a fragmentos peptídicos de fitase pequenos) ou purificados de organismos nos quais são naturalmente expressos. Os métodos de expressão recombinante úteis incluem hospedeiros mamíferos, hospedeiros microbianos e hospedeiros vegetais.

[00405] Em aspectos alternativos, os polipeptídeos e os peptídeos da invenção compreendem "aminoácidos" ou "sequências de aminoácidos" que são oligopeptídeos, peptídeos, polipeptídeos ou sequências de proteínas ou alternativamente, são fragmentos, partes ou subunidades de qualquer um destes e de moléculas que ocorrem naturalmente ou sintéticas.

[00406] Em aspectos alternativos, os polipeptídeos ou as proteínas "recombinantes" da invenção incluem (referem-se a) polipeptídeos ou proteínas produzidas por técnicas de DNA recombinante; por exemplo, produzidas partindo de células transformadas por uma construção de DNA exógena que codifica o polipeptídeo ou a proteína desejada. Os ácidos nucleicos (incluindo oligonucleotídeos), os polipeptídeos ou as proteínas "sintéticas" da invenção incluem as preparadas através de síntese química, como descrito em detalhes aqui. Em aspectos alternativos, os polipeptídeos ou as proteínas da invenção compreendem aminoácidos ligados um com os outros através de ligações peptídicas ou ligações peptídicas modificadas, isto é, isoésteres peptídicos e podem conter aminoácidos modificados sem ser os 20 aminoácidos codificados pelos genes. Os polipeptídeos podem ser modificados através de processos naturais, tal como o processamento pós-tradução ou através de técnicas de modificação química que são bem

conhecidas na técnica. As modificações podem ocorrer em qualquer local no polipeptídeo, incluindo a estrutura peptídica, as cadeias laterais dos aminoácidos e os terminais amino ou carboxila. Será considerado que o mesmo tipo de modificação pode estar presente no mesmo ou em graus variáveis em vários sítios em um certo polipeptídeo. Ainda, um certo polipeptídeo pode ter muitos tipos de modificações, por exemplo, acetilação, acilação, ADP-ribosilação, amidação, ligação covalente de flavina, ligação covalente de um grupamento heme, ligação covalente de um nucleotídeo ou de um derivado de nucleotídeo, ligação covalente de um lipídeo ou de um derivado de lipídeo, ligação covalente de um fosfatidilinositol, ciclização por reticulação, formação de pontes dissulfeto, desmetilação, formação de ligações cruzadas covalentes, formação de cisteína, formação de piroglutamato, formilação, gama-carboxilação, glicosilação, formação de ancoragem de GPI, hidroxilação, iodização, metilação, miristoliação, oxidação, peguilação, processamento proteolítico, fosforilação, prenilação, racemização, selenoilação, sulfatização e adição de aminoácidos mediada por RNA de transferência à proteína tal como arginilação.

[00407] Em aspectos alternativos, polipeptídeos ou proteínas "sintéticas" são aqueles preparados através de síntese química. Os métodos de síntese química de peptídeos em fase sólida podem também ser utilizados para sintetizar o polipeptídeo ou os fragmentos da invenção. Tal método é conhecido na técnica desde o início dos anos 60 (Merrifield, R. B., J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154, 1963) (Ver também Stewart, J. M. e Young, J. D., Solid Phase Peptide Synthesis, 2 ed., Pierce Chemical Co., Rockford, Ill., pp. 11-12)) e foram recentemente empregados nos kits de planejamento e síntese de peptídeos em laboratório disponíveis comercialmente (Cambridge Research Biochemicals). Tais kits de laboratório disponíveis

comercialmente utilizaram de forma geral os ensinamentos de H. M. Geysen e outros, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81:3998 (1984) e fornecem a síntese de peptídeos sobre as pontas de um grande número de "bastões" ou "pinos" dos quais todos são conectados a uma única placa. Quando tal sistema é utilizado, uma placa de bastões ou pinos é invertida e inserida em uma segunda placa de poços ou reservatórios correspondentes, que contêm soluções para a ligação ou para a ancoragem de um aminoácido apropriado nas pontas dos pinos ou dos bastões. Repetindo tal etapa do processo, isto é, invertendo e inserindo as pontas dos bastões e dos pinos em soluções apropriadas, os aminoácidos são montados em peptídeos desejados. Em adição, está disponível um número de sistemas de síntese de peptídeos FMOC disponíveis. Por exemplo, a montagem de um polipeptídeo ou de um fragmento pode ser realizada sobre um suporte sólido utilizando um sintetizador de peptídeos automatizado da Applied Biosystems, Inc. Modelo 431A. Tal equipamento fornece um acesso fácil aos peptídeos da invenção, através da síntese direta ou através da síntese de uma série de fragmentos que podem ser acoplados utilizando outras técnicas conhecidas.

[00408] Em aspectos alternativos, os peptídeos e os polipeptídeos da invenção são glicosilados. A glicosilação pode ser adicionada após a tradução de forma química ou através de mecanismos biossintéticos celulares, em que o último incorpora o uso de motivos de glicosilação conhecidos, que podem ser nativos da sequência ou podem ser adicionados como um peptídeo ou adicionados na sequência de ácido nucleico codificadora. A glicosilação pode ser ligada ao O ou ligada ao N ou, uma combinação destas.

[00409] Em aspectos alternativos, os peptídeos e os polipeptídeos da invenção, como definido anteriormente, compreendem formas "miméticas" e

"peptidomiméticas", em parte ou completamente. Em um aspecto, os termos "mimético" e "peptidomimético" referem-se a um composto químico sintético que possui substancialmente as mesmas características estruturais e/ou funcionais dos polipeptídeos da invenção. O mimético pode ser composto inteiramente de análogos não-naturais sintéticos de aminoácidos ou, é uma molécula quimérica de aminoácidos de peptídeos parcialmente naturais e análogos de aminoácidos parcialmente não-naturais. O mimético também pode incorporar qualquer quantidade de substituições conservativas de aminoácidos naturais contanto que tais substituições também não alterem substancialmente a estrutura e/ou a atividade do mimético. Como com os polipeptídeos da invenção que são variações conservativas, experimentos de rotina determinarão se um mimético está dentro do escopo da invenção, isto é, se sua estrutura e/ou função não é substancialmente alterada. Assim, em um aspecto, uma composição mimética está dentro do âmbito da invenção se esta tiver uma atividade de fitase.

[00410] Em aspectos alternativos, os peptídeos e os polipeptídeos da invenção possuem sequências que compreendem a modificação específica na SEQ ID NO: 2, como definido anteriormente e também substituições conservativas que podem ou não modificar a atividade, por exemplo, a atividade enzimática. Em aspectos alternativos, as substituições conservativas são aquelas que substituem um certo aminoácido em um polipeptídeo com um outro aminoácido de características similares. Em aspectos alternativos, as substituições conservativas são as substituições a seguir: substituições de um aminoácido alifático tal como Ala, Val, Leu e Ile com um outro aminoácido alifático; substituição de uma Ser com uma Thr ou vice-versa; substituição de um resíduo ácido tal como Asp e Glu com um outro resíduo ácido; substituição de um resíduo que carrega um grupo

amida, tal como Asn e Gln, com um outro resíduo que carrega um grupo amida; troca de um resíduo básico tal como Lys e Arg por um outro resíduo básico; e substituição de um resíduo aromático tal como Phe, Tyr com um outro resíduo aromático.

[00411] As composições miméticas de polipeptídeos da invenção podem conter qualquer combinação de componentes estruturais não-naturais. Em um aspecto alternativo, as composições miméticas da invenção incluem um ou todos dos três grupos estruturais a seguir: a) grupos de ligação de resíduos sem ser as ligações de amida naturais ("ligação peptídica"); b) resíduos não-naturais no lugar de resíduos de aminoácidos que ocorrem naturalmente; ou c) resíduos que induzem mimetismo estrutural secundário, isto é, induzem ou estabilizam uma estrutura secundária, por exemplo, uma conformação de volta beta, de volta gama, de folha beta, de alfa hélice e similares. Por exemplo, um polipeptídeo da invenção pode ser caracterizado como um mimético quando todos ou alguns de seus resíduos são ligados através de meios químicos sem ser as ligações peptídicas naturais. Os resíduos peptidomiméticos individuais podem ser ligados através de ligações peptídicas, outras ligações químicas ou meios de acoplamento, tal como, por exemplo, glutaraldeído, ésteres de N-hidroxissuccinimida, maleimidas bifuncionais, N,N'-diciclo-hexilcarbodi-imida (DCC) ou N,N'-di-isopropilcarbodi-imida (DIC). Os grupos de ligação que podem ser uma alternativa para as ligações de amida tradicionais ("ligação peptídica") incluem, por exemplo, cetometileno (por exemplo, -C(=O)-CH₂- para -C(=O)-NH-), aminometileno (CH₂-NH), etileno, olefina (CH=CH), éter (CH₂-O), tioéter (CH₂-S), tetrazol (CN₄-), tiazol, retroamida, tioamida ou éster (ver, por exemplo, Spatola (1983) in Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol. 7,

pp 267-357, "Peptide Backbone Modifications", Marcell Dekker, NY).

[00412] Um polipeptídeo da invenção também pode ser caracterizado como um mimético por conter todos ou alguns resíduos não-naturais no lugar de resíduos de aminoácidos que ocorrem naturalmente. Os resíduos não-naturais são bem descritos na literatura científica e de patentes; alguns dos exemplos de composições não-naturais úteis como miméticos de resíduos de aminoácidos naturais e normas de procedimento são descritos a seguir. Os miméticos de aminoácidos aromáticos podem ser gerados através da substituição, por exemplo, com D- ou L- nafilalanina; D- ou L- fenilglicina; D- ou L-2 tienoilalanina; D- ou L-1, -2, 3- ou 4- pirenoilalanina; D- ou L-3 tienoilalanina; D- ou L-(2-piridinil)-alanina; D- ou L-(3-piridinil)-alanina; D- ou L-(2-pirazinil)-alanina; D- ou L-(4-isopropil)-fenilglicina; D-(trifluorometil)-fenilglicina; D-(trifluorometil)-fenilalanina; D-p-fluorofenilalanina; D- ou L-p-bifenilfenilalanina; K- ou L-p-metóxi-bifenilfenilalanina; D- ou L-2-indol(alquil)alaninas; e, D- ou L-alquilalaninas, em que alquila pode ser metila, etila, propila, hexila, butila, pentila, isopropila, iso-butila, sec-isotila, iso-pentila substituída ou não substituído ou aminoácidos não ácidos. Os anéis aromáticos de um aminoácido não-natural incluem, por exemplo, anéis aromáticos de tiazolila, tiofenila, pirazolila, benzimidazolila, naftila, furanila, pirrolila e piridila.

[00413] Os miméticos de aminoácidos ácidos podem ser gerados através da substituição, por exemplo, com aminoácidos não-carboxilados enquanto que uma carga negativa é mantida; (fosfono)alanina; treonina sulfatada. Grupos laterais carboxila (por exemplo, aspartila ou glutamila) também podem ser seletivamente modificados através da reação com carbodi-imidas (R'-N-C-N-R') tal como, por exemplo, 1-ciclo-hexil-3(2-morfolinil-(4-etil) carbodi-imida ou 1-etil-3(4-azonia-4,4-dimetolpentil)

carbodi-imida. Aspartila ou glutamila também pode ser convertido em resíduos de asparaginila e glutaminila através da reação com íons de amônio. Os miméticos de aminoácidos básicos também podem ser gerados através da substituição, por exemplo, (em adição à lisina e à arginina) com os aminoácidos ornitina, citrulina ou ácido (guanidino)-acético ou ácido (guanidino)alquil-acético, em que alquila é definido anteriormente. O derivado de nitrila (por exemplo, que contém o grupo CN no lugar de COOH) pode ser substituído com asparagina ou glutamina. Os resíduos de asparaginila e glutaminila podem ser desaminados nos resíduos aspartila ou glutamila correspondentes. Os miméticos do resíduo de arginina podem ser gerados através da reação de arginila, por exemplo, com um ou mais reagentes convencionais, incluindo, por exemplo, fenilglioal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclo-hexanodiona ou ninhidrina, que para estes reagentes pode ser preferível utilizar condições alcalinas. Os miméticos do resíduo de tirosina podem ser gerados através da reação de tirosila, por exemplo, com compostos de diazônio aromáticos ou tetranitrometano. O N-acetilimidazol e o tetranitrometano podem ser utilizados para formar espécies de O-acetil tirosila e derivados de 3-nitro, respectivamente. Os miméticos do resíduo de cisteína podem ser gerados através da reação de resíduos de cisteinila, por exemplo, com alfa-haloacetatos tal como ácido 2-cloroacético ou cloroacetamida e aminas correspondentes; para fornecer derivados de carboximetila ou de carboxiamidometila. Os miméticos do resíduo de cisteína também podem ser gerados através da reação dos resíduos de cisteinila, por exemplo, com bromo-trifluoroacetona, ácido alfa-bromo-beta-(5-imidozoi)l) propiônico; fosfato de cloroacetila, N-alquilmaleimidas, dissulfeto de 3-nitro-2-piridila; dissulfeto de metil 2-piridila; p-cloromercuribenzoato; 2-cloromercuri-4 nitrofenol; ou, cloro-7-nitrobenzo-

oxa-1,3-diazol. Os miméticos de lisina podem ser gerados (e os resíduos amino terminais podem ser alterados) através da reação de lisinila, por exemplo, com anidrido do ácido succínico ou de outros ácidos carboxílicos. Os miméticos de lisina e outros que contêm alfa-amino também podem ser gerados através da reação com imidoésteres, tais como picolinimidato de metila, fosfato piridoxal, piridoxal, cloroborohidreto, ácido trinitro-benzenossulfônico, O-metilisourea, 2,4, pentanodiona e reações catalisadas por transamidase com glioxilato. Os miméticos de metionina podem ser gerados através da reação, por exemplo, com sulfóxido de metionina. Os miméticos de prolina incluem, por exemplo, ácido pipecólico, ácido tiazolidina carboxílico, 3- ou 4- hidróxi prolina, desidroprolina, 3- ou 4-metilprolina ou 3,3,-dimetilprolina. Os miméticos do resíduo de histidina podem ser gerados através da reação do histidila, por exemplo, com dietilprocarbonato ou brometo de para-bromofenacila. Outros miméticos incluem, por exemplo, os gerados através da hidroxilação de prolina e lisina; fosforilação dos grupos hidroxila de resíduos de serila ou treonila; metilação dos grupos alfa-amino de lisina, arginina e histidina; acetilação da amina N-terminal; metilação dos resíduos amida da cadeia principal ou substituição com aminoácidos N-metila; ou amidação de grupos carboxila C-terminais.

[00414] Um resíduo, por exemplo, um aminoácido, de um polipeptídeo da invenção também pode ser substituído com um aminoácido (ou resíduo peptidomimético) da quiralidade oposta. Assim, qualquer aminoácido que ocorre naturalmente na configuração L (que pode também ser referido como R ou S, dependendo da estrutura da entidade química) pode ser substituído com o aminoácido do mesmo tipo de estrutura química ou um peptidomimético, mas da quiralidade oposta, referido como o D-aminoácido, mas também pode ser referido como a forma R ou S.

[00415] A invenção fornece ainda métodos para a modificação dos polipeptídeos da invenção através de processos naturais, tal como o processamento pós-tradução (por exemplo, fosforilação, acilação etc) ou através de técnicas de modificação química e os polipeptídeos modificados resultantes. As modificações podem ocorrer em qualquer local no polipeptídeo, incluindo a estrutura do peptídeo, as cadeias laterais dos aminoácidos e os terminais amino ou carboxila. Será considerado que o mesmo tipo de modificação pode estar presente no mesmo ou em graus variáveis em vários sítios em um certo polipeptídeo. Ainda, um certo polipeptídeo pode ter muitos tipos de modificações. As modificações incluem acetilação, acilação, ADP-ribosilação, amidação, ligação covalente de flavina, ligação covalente de um grupo heme, ligação covalente de um nucleotídeo ou um derivado de nucleotídeo, ligação covalente de um lipídeo ou um derivado de lipídeo, ligação covalente de um fosfatidilinositol, ciclização de reticulação, formação de pontes dissulfeto, desmetilação, formação de ligações cruzadas covalentes, formação de cisteína, formação de piroglutamato, formilação, gama-carboxilação, glicosilação, formação de ancoragem de GPI, hidroxilação, iodização, metilação, miristoliação, oxidação, peguilação, processamento proteolítico, fosforilação, prenilação, racemização, selenoilação, sulfatização e adição de aminoácidos mediada por RNA de transferência para a proteína tal como a arginilação. Ver, por exemplo, Creighton, T.E., *Proteins – Structure and Molecular Properties* 2ª Ed., W.H. Freeman and Company, Nova York (1993); *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, Nova York, pp. 1-12 (1983).

[00416] Os métodos de síntese química de peptídeos em fase sólida também podem ser utilizados para sintetizar, o polipeptídeo ou os

fragmentos da invenção. Tal método é conhecido na técnica desde o início dos anos 60 (Merrifield, R. B., J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154, 1963) (Ver também Stewart, J. M. e Young, J. D., Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª Ed., Pierce Chemical Co., Rockford, Ill., pp. 11-12)) e foram empregados recentemente em kits para planejamento e síntese de peptídeos em laboratório disponíveis comercialmente (Cambridge Research Biochemicals). Tais kits de laboratório disponíveis comercialmente utilizaram de forma geral os ensinamentos de H. M. Geysen e outros, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81:3998 (1984) e fornecem a síntese de peptídeos sobre as pontas de um grande número de "bastões" ou "pinos" dos quais todos são conectados a uma única placa. Quando tal sistema é utilizado, uma placa de bastões ou pinos é invertida e inserida em uma segunda placa de poços ou reservatórios correspondentes, que contêm soluções para a ligação ou para a ancoragem de um aminoácido apropriado nas pontas dos pinos ou dos bastões. Através da repetição de tal etapa do processo, isto é, da inversão e da inserção das pontas dos bastões e dos pinos nas soluções apropriadas, os aminoácidos são montados em peptídeos desejados. Em adição, está disponível um número de sistemas de síntese de peptídeos FMOC disponíveis. Por exemplo, a montagem de um polipeptídeo ou de um fragmento pode ser realizada sobre um suporte sólido utilizando um sintetizador de peptídeos automático Applied Biosystems, Inc. Modelo 431A[®]. Tal equipamento fornece acesso fácil aos peptídeos da invenção, através da síntese direta ou através da síntese de uma série de fragmentos que podem ser acoplados utilizando outras técnicas conhecidas.

[00417] Em um aspecto, os peptídeos e os polipeptídeos da invenção possuem sequências que compreendem a modificação específica na SEQ ID NO: 2, como definido anteriormente e também sequências de aminoácidos

"substancialmente idênticas", isto é, uma sequência que difere em uma ou mais substituições, deleções ou inserções de aminoácidos conservativas ou não-conservativas, particularmente quando tal substituição ocorre em um sítio que não é o sítio ativo da molécula e contanto que o polipeptídeo mantenha essencialmente suas propriedades funcionais. Em um aspecto, os peptídeos e os polipeptídeos da invenção possuem sequências que compreendem a modificação específica na SEQ ID NO: 2, como definido anteriormente e substituições conservativas de aminoácidos que substituem um aminoácido com um outro da mesma classe, por exemplo, a substituição de um aminoácido hidrofóbico, tal como isoleucina, valina, leucina ou metionina, com um outro ou a substituição de um aminoácido polar com um outro, tal como a substituição de arginina com lisina, ácido glutâmico com ácido aspártico ou glutamina com asparagina. Em um aspecto, um ou mais aminoácidos podem ser deletados, por exemplo, de um polipeptídeo de fitase da invenção para resultar na modificação da estrutura do polipeptídeo sem alterar significativamente sua atividade biológica ou alternativamente, para alterar significativamente de forma proposital sua atividade biológica. Por exemplo, aminoácidos amino ou carboxila terminais que são necessários ou alternativamente não necessários, para a atividade biológica de fitase podem ser removidos e/ou adicionados. As sequências de polipeptídeos modificadas da invenção podem ser analisadas em relação à atividade biológica de fitase através de qualquer número de métodos, incluindo o contato da sequência de polipeptídeo modificada com um substrato de fitase e a determinação do fato do polipeptídeo modificado diminuir a quantidade de substrato específico no ensaio ou aumentar os produtos biológicos da reação enzimática de um polipeptídeo de fitase funcional com o substrato.

[00418] Um outro aspecto da invenção compreende polipeptídeos que

possuem aproximadamente 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais identidade de sequência em relação à SEQ ID NO: 2 e que possuem uma das modificações de sequência enumeradas específicas, como discutido (apresentado) anteriormente.

[00419] Estas variações de sequências de aminoácidos da invenção podem ser caracterizadas por uma natureza predeterminada da variação, uma característica que as separa de uma forma que ocorre naturalmente, por exemplo, uma variação alélica ou interespecie de uma sequência de fitase. Em um aspecto, as variações da invenção exibem a mesma atividade biológica qualitativa que o análogo que ocorre naturalmente. Alternativamente, as variações podem ser selecionadas por possuírem características modificadas. Em um aspecto, embora o sítio ou a região para a introdução de uma variação de sequência de aminoácidos seja predeterminada, a mutação per se não precisa ser predeterminada. Por exemplo, com a finalidade de otimizar o desempenho de uma mutação em um certo sítio, a mutagênese aleatória pode ser realizada no códon ou na região-alvo e as variações de fitase expressa verificadas em relação à combinação ótima de atividade desejada. As técnicas para produzir mutações de substituição em sítios predeterminados no DNA que possui uma sequência conhecida são bem conhecidas, como discutido aqui, por exemplo, mutagênese com iniciador de M13 e mutagênese por PCR. A classificação dos mutantes pode ser feita utilizando, por exemplo, ensaios de catálise de fitato (myo-inositol-hexafosfato) em inositol e fosfato inorgânico; ou, a hidrólise de fitato (myo-inositol-hexafosfato). Em aspectos alternativos, as substituições de aminoácidos podem ocorrer em resíduos

isolados; as inserções podem ocorrer na ordem de aproximadamente 1 até 20 aminoácidos, embora inserções consideravelmente maiores possam ser realizadas. As deleções podem variar de aproximadamente 1 até aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70 resíduos ou mais. Para a obtenção de um derivado final como propriedades ótimas, podem ser utilizadas substituições, deleções, inserções ou qualquer combinação das mesmas. Geralmente, estas alterações são feitas em algumas aminoácidos para minimizar a alteração da molécula. Entretanto, alterações maiores podem ser toleradas em certas circunstâncias.

[00420] Os polipeptídeos da invenção podem ser obtidos através de procedimentos de enriquecimento bioquímico ou de purificação. A sequência de polipeptídeos potencialmente homólogos ou de fragmentos pode ser determinada através da digestão proteolítica, da eletroforese em gel e/ou do microsequenciamento.

[00421] Um outro aspecto da invenção é um ensaio para a identificação de fragmentos ou de variações dos polipeptídeos da invenção. Os polipeptídeos da invenção podem ser utilizados para catalisar reações bioquímicas para indicar que o dito fragmento ou a dita variação mantém a atividade enzimática dos polipeptídeos da invenção.

[00422] Um exemplo de ensaio para determinar se os fragmentos de variações mantêm a atividade enzimática dos polipeptídeos da invenção compreende as etapas de: contato do fragmento ou da variação do polipeptídeo com uma molécula de substrato sob condições que permitem que o fragmento ou a variação do polipeptídeo funcione e detecção de um aumento no nível de substrato ou de um aumento no nível do produto de reação específico da reação entre o polipeptídeo e o substrato.

[00423] Os polipeptídeos da invenção podem ser utilizados para

catalisar reações bioquímicas. De acordo com um aspecto da invenção, é fornecido um processo para a utilização de um polipeptídeo da invenção como uma fitase.

[00424] A invenção fornece fitases não possuem ou possuem sequências sinais modificadas (também chamadas de peptídeos sinais (SPs) ou peptídeos líderes) ou sequências sinais heterólogas. Os polipeptídeos da invenção também podem não possuir ou possuir domínios pré-pró e/ou domínios catalíticos (CDs) modificados ou heterólogos. Os SPs, os domínios pré-pró e/ou os CDs modificados ou heterólogos incorporados em um polipeptídeo da invenção podem fazer parte de uma proteína de fusão, por exemplo, na forma de um domínio heterólogo em uma proteína quimérica ou adicionados através de um agente de ligação química. Por exemplo, uma enzima da invenção pode compreender um SP e/ou um pré-pró heterólogo em um vetor, por exemplo, um vetor da série pPIC (Invitrogen, Carlsbad, CA).

[00425] Adicionalmente, os polipeptídeos da invenção podem compreender ainda sequências heterólogas, sequências de outras fitases ou de fontes sem ser fitase ou sequências totalmente sintéticas. Assim, em um aspecto, um ácido nucleico da invenção compreende uma sequência codificadora para uma sequência sinal (SP), um domínio pré-pró e/ou um domínio catalítico endógeno, modificado ou heterólogo e uma sequência heteróloga (isto é, uma sequência que não-está naturalmente associada à sequência sinal (SP), ao domínio pré-pró e/ou ao domínio catalítico (CD) da invenção). A sequência heteróloga pode estar na extremidade terminal 3', na extremidade terminal 5' e/ou em ambas as extremidades do SP, do domínio pré-pró e/ou da sequência codificadora do CD.

[00426] Os métodos para a identificação das sequências do domínio

"pré-pró" e das sequências sinais são bem conhecidos na técnica, ver, por exemplo, Van de Ven (1993) Crit. Rev. Oncog. 4(2):115-136. Por exemplo, para a identificação de uma sequência pré-pró, a proteína é purificada partindo do espaço extracelular e a sequência da proteína N-terminal é determinada e comparada com a forma não processada. Vários métodos de reconhecimento de sequências sinais são conhecidos pelos versados na técnica. Por exemplo, em um aspecto, os peptídeos sinais para uso com os polipeptídeos da invenção são identificados através de um método referido como SignalP. O SignalP utiliza uma rede neural combinada que reconhece tanto os peptídeos sinais quanto seus sítios de clivagem; ver, por exemplo, Nielsen (1997) "Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites" Protein Engineering 10:1-6.

[00427] A invenção fornece enzimas fitases em que a estrutura da base do polipeptídeo, a estrutura secundária ou terciária, por exemplo, uma estrutura em alfa-hélice ou em folha beta, foi modificada. Em um aspecto, a carga ou a hidrofobicidade foi modificada. Em um aspecto, a massa da cadeia lateral foi modificada. Alterações substanciais na função e na identidade imunológica são feitas através da seleção de substituições que são menos conservativas. Por exemplo, podem ser feitas substituições que afetam mais significativamente: a estrutura da base do polipeptídeo na área da alteração, por exemplo, uma estrutura em alfa-hélice ou em folha beta; uma carga ou um sítio hidrofóbico da molécula, que pode estar em um sítio ativo; ou uma cadeia lateral. A invenção fornece substituições no polipeptídeo da invenção em que (a) um resíduo hidrofílico, por exemplo, serila ou treonila, é substituído com (ou por) um resíduo hidrofóbico, por exemplo, leucila, isoleucila, fenilalanila, valila ou alanila; (b) uma cisteína ou uma prolina é substituída com (ou por) qualquer outro resíduo; (c) um

resíduo que possui uma cadeia lateral eletropositiva, por exemplo, lisila, arginila ou histidila, é substituído com (ou por) um resíduo eletronegativo, por exemplo, glutamila ou aspartila; ou (d) um resíduo que possui uma cadeia lateral volumosa, por exemplo, fenilalanina, é substituído com (ou por) um que não possui uma cadeia lateral, por exemplo, glicina. As variações podem exibir a mesma atividade biológica qualitativa (isto é, atividade de enzima fitase) embora as variações possam ser selecionadas para a modificação das características da fitase quando necessário.

[00428] Em um aspecto, as fitases da invenção compreendem epitopos ou marcações para purificação, sequências sinais ou outras sequências de fusão etc. Em um aspecto, as fitases da invenção podem ser fundidas a um peptídeo aleatório para formar um polipeptídeo de fusão. Por "fundido" ou "ligado de forma operacional" aqui se entende que o peptídeo aleatório e a fitase estão ligados, de tal maneira a minimizar a interrupção na estabilidade da atividade de fitase. O polipeptídeo de fusão (ou o polinucleotídeo de fusão que codifica o polipeptídeo de fusão) pode compreender também componentes adicionais, incluindo vários peptídeos em várias voltas.

[00429] Em um aspecto, as fitases da invenção são polipeptídeos quiméricos, por exemplo, que compreendem SPs heterólogos, módulos de ligação com carboidratos, domínios catalíticos da enzima fitase, ligantes e/ou domínios catalíticos sem ser da fitase. A invenção fornece um meio para gerar polipeptídeos quiméricos que podem codificar polipeptídeos híbridos biologicamente ativos (por exemplo, enzimas fitases híbridas). Em um aspecto, os polinucleotídeos originais codificam polipeptídeos biologicamente ativos. O método da invenção produz novos polipeptídeos híbridos através da utilização de processos celulares que integram a

sequência dos polinucleotídeos originais de forma que o polinucleotídeo híbrido resultante codifica um polipeptídeo que demonstra atividades derivadas dos polipeptídeos biologicamente ativos originais. Por exemplo, os polinucleotídeos originais podem codificar uma enzima particular partindo de micro-organismos diferentes. Uma enzima codificada por um primeiro polinucleotídeo de um organismo ou variação pode, por exemplo, funcionar eficientemente sob uma condição ambiental particular, por exemplo, salinidade alta. Uma enzima codificada por um segundo polinucleotídeo de um organismo ou variação diferente pode funcionar eficientemente sob uma condição ambiental diferente, tal como temperaturas extremamente altas. Um polinucleotídeo híbrido que contém sequências do primeiro e do segundo polinucleotídeos originais pode codificar uma enzima que exhibe características de ambas as enzimas codificadas pelos polinucleotídeos originais. Assim, a enzima codificada pelo polinucleotídeo híbrido pode funcionar eficientemente sob condições ambientais compartilhadas por cada uma das enzimas codificadas pelo primeiro e pelo segundo polinucleotídeos, por exemplo, salinidade alta e temperaturas extremas.

[00430] Assim, um polipeptídeo híbrido que resulta deste método da invenção pode exibir atividade enzimática especializada não exibida nas enzimas originais. Por exemplo, após a recombinação e/ou o reagrupamento redutivo dos polinucleotídeos que codificam as enzimas fitases, o polipeptídeo híbrido resultante codificado por um polinucleotídeo híbrido pode ser verificado em relação às atividades enzimáticas especializadas, por exemplo, hidrolase, peptidase, fosforilase etc., atividades, obtidas de cada uma das enzimas originais. Assim, por exemplo, o polipeptídeo híbrido pode ser verificado para determinar as funcionalidades químicas que distinguem o

polipeptídeo híbrido dos polipeptídeos parentais originais, tal como a temperatura, o pH ou a concentração de sal em que o polipeptídeo híbrido funciona.

[00431] Um polipeptídeo híbrido resultante do método da invenção pode exibir uma atividade enzimática especializada não exibida nas enzimas originais. Por exemplo, após a recombinação e/ou o reagrupamento redutivo dos polinucleotídeos que codificam atividades de hidrolase, o polipeptídeo híbrido resultante codificado por um polinucleotídeo híbrido pode ser verificado em relação às atividades de hidrolase especializadas obtidas partindo de cada uma das enzimas originais, isto é, o tipo de ligação sobre o qual a hidrolase atua e a temperatura na qual a hidrolase funciona. Assim, por exemplo, uma fitase pode ser verificada para determinar as funcionalidades químicas que distinguem uma fitase híbrida das fitases originais, tais como: (a) amida (ligações peptídicas), isto é, proteases; (b) ligações éster, isto é, esterases e lipases; (c) acetais, isto é, glicosidases e, por exemplo, a temperatura, o pH ou a concentração de sal em que o polipeptídeo híbrido funciona.

[00432] Em um aspecto, a invenção refere-se a um método para a produção de um polipeptídeo híbrido biologicamente ativo e para a classificação de tal polipeptídeo em relação à maior atividade através de:

- 1) introdução de pelo menos um primeiro polinucleotídeo em ligação operacional e um segundo polinucleotídeo em ligação operacional, os ditos pelo menos primeiro polinucleotídeo e segundo polinucleotídeo compartilhado pelo menos uma região de homologia de sequência parcial, em uma célula hospedeira adequada;

- 2) crescimento da célula hospedeira sob condições que promovem a reorganização da sequência resultando em um polinucleotídeo

híbrido em ligação operacional;

3) expressão de um polipeptídeo híbrido codificado pelo polinucleotídeo híbrido;

4) classificação do polipeptídeo híbrido sob condições que promovem a identificação de maior atividade biológica; e

5) isolamento de um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo híbrido.

[00433] Os métodos para a classificação em relação às várias atividades enzimáticas são conhecidos pelos versados na técnica e são discutidos ao longo de todo o presente relatório descritivo. Tais métodos podem ser empregados quando os polipeptídeos e os polinucleotídeos da invenção são isolados.

[00434] Em um aspecto, a presente invenção fornece um método (e produtos do mesmo) de produção de formulações líquidas aquosas estabilizadas que possuem atividade de fitase que exibem maior resistência à inativação térmica da atividade enzimática e que mantêm sua atividade de fitase durante períodos prolongados de armazenamento. As formulações líquidas são estabilizadas através da adição de ureia e/ou um poliol tal como sorbitol e glicerol como agente estabilizante. São também fornecidas preparações para produtos alimentícios para animais monogástricos e métodos para a produção das mesmas que resultam do uso de tais formulações líquidas aquosas estabilizadas. Detalhes adicionais em relação a esta abordagem estão na literatura pública e/ou são conhecidos pelo versado na técnica. Em um exemplo não-limitante particular, tal literatura disponível ao público inclui a EP 0626010 (W0 9316175 A1) (Barendse e outros), embora as referências na literatura disponível ao público não ensinem as moléculas inventivas do presente pedido de patente.

Anticorpos e métodos de classificação baseados em anticorpo

[00435] A invenção proporciona anticorpos isolados, sintéticos ou recombinantes que se ligam especificamente a uma fitase da invenção. Esses anticorpos podem ser usados para isolar, identificar ou quantificar as fitases da invenção ou polipeptídeos relacionados. Esses anticorpos podem ser usados para inibir a atividade de uma enzima da invenção. Esses anticorpos podem ser usados para isolar polipeptídeos relacionados àqueles da invenção, por exemplo, enzimas fitase relacionadas.

[00436] Os anticorpos da invenção podem compreender um peptídeo ou polipeptídeo derivado de, modelado após ou substancialmente codificado por um gene de imunoglobulina ou genes de imunoglobulina ou fragmentos dos mesmos capazes de se ligar especificamente a um antígeno ou epitopo, veja, por exemplo, Fundamental Immunology, Terceira Edição, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993); Wilson (1994) J. Immunol. Methods 175: 267-273; Yarmush (1992) J. Biochem. Biophys. Methods 25: 85-97. O termo anticorpo inclui porções de ligação a antígeno, isto é, "sítios de ligação a antígeno" (por exemplo, fragmentos, subsequências, regiões de determinação de complementaridade (CDRs)) que retêm a capacidade de se ligar a um antígeno, incluindo (i) um fragmento Fab, um fragmento monovalente consistindo nos domínios VL, VH, CL e CH1; (ii) um fragmento F(ab')₂, um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos Fab ligados através de uma ligação de dissulfeto na região de dobradiça; (iii) um fragmento Fd consistindo nos domínios VH e CH1; (iv) um fragmento Fv consistindo nos domínios VL e VH de um único braço de um anticorpo; (v) um fragmento dAb (Ward e outros (1989) Nature 341: 544-546), o qual consiste em um domínio VH; e (vi) uma região de determinação de complementaridade (CDR) isolada. Anticorpos com uma única cadeia

também são incluídos por referência ao termo "anticorpo".

[00437] Os anticorpos podem ser usados em imunoprecipitação, coloração (por exemplo, FACS), colunas de imunoafinidade e semelhantes. Se desejado, sequências de ácido nucleico que codificam antígenos específicos podem ser geradas através de imunização, seguido por isolamento do polipeptídeo ou ácido nucleico, amplificação ou clonagem e imobilização do polipeptídeo sobre um arranjo da invenção. Alternativamente, os métodos da invenção podem ser usados para modificar a estrutura de um anticorpo produzido por uma célula a ser modificada, por exemplo, a afinidade de um anticorpo pode ser aumentada ou diminuída. Além disso, a capacidade de fazer ou modificar anticorpos pode ser um fenotipo manipulado em uma célula através dos métodos da invenção.

[00438] Métodos de imunização, produção e isolamento de anticorpos (policlonais e monoclonais) são conhecidos por aqueles versados na técnica e descritos na literatura científica e de patente, veja, por exemplo, Coligan, CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY (1991); Stites (eds.) BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY (7^a ed.) Lange Medical Publications, Los Altos, CA ("Stites"); Goding, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE (2^a ed.) Academic Press, New York, NY (1986); Kohler (1975) Nature 256: 495; Harlow (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Publications, New York. Anticorpos também podem ser gerados in vitro, por exemplo, usando bibliotecas de visualização de fago expressando um sítio de ligação de anticorpo recombinante, além dos métodos tradicionais in vivo usando cobaias. Veja, por exemplo, Hoogenboom (1997) Trends Biotechnol. 15: 62-70; Katz (1997) Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26: 27-45.

[00439] Os polipeptídeos podem ser usados para gerar anticorpos os

quais se ligam especificamente aos polipeptídeos da invenção. Os anticorpos resultantes podem ser usados em procedimentos de cromatografia por imunoafinidade para isolar ou purificar o polipeptídeo ou determinar se o polipeptídeo está presente em uma amostra biológica. Em tais procedimentos, uma preparação de proteína, tal como um extrato ou uma amostra biológica é contatada a um anticorpo capaz de se ligar especificamente a um dos polipeptídeos da invenção.

[00440] Em procedimentos de imunoafinidade, o anticorpo é preso a um suporte sólido, tal como um glóbulo ou outra matriz de coluna. A preparação de proteína é colocada em contato com o anticorpo sob condições nas quais o anticorpo se liga especificamente a um dos polipeptídeos da invenção. Após uma lavagem para remover as proteínas não especificamente ligadas, os polipeptídeos especificamente ligados são eluídos.

[00441] A capacidade das proteínas em uma amostra biológica de se ligar ao anticorpo pode ser determinada usando qualquer um de uma variedade de procedimentos familiares para aqueles versados na técnica. Por exemplo, a ligação pode ser determinada através de rotulação do anticorpo com um rótulo detectável, tal como um rótulo fluorescente, um rótulo enzimático ou um radioisótopo. Alternativamente, a ligação do anticorpo à amostra pode ser detectada usando um anticorpo secundário tendo tal rótulo detectável sobre o mesmo. Ensaio particulares incluem ensaios ELISA, ensaios em sanduíche, radioimunoensaio e Western blots.

[00442] Anticorpos policlonais gerados contra os polipeptídeos da invenção podem ser obtidos através de injeção direta dos polipeptídeos em um animal ou através de administração dos polipeptídeos a um animal, por exemplo, um não-humano. O anticorpo assim obtido, então, se ligará ao

polipeptídeo em si. Dessa maneira, mesmo uma sequência que codifica apenas um fragmento do polipeptídeo pode ser usada para gerar anticorpos os quais podem se ligar ao polipeptídeo nativo todo. Tais anticorpos podem, então, ser usados para isolar o polipeptídeo de células expressando esse polipeptídeos.

[00443] Para a preparação de anticorpos monoclonais, qualquer técnica a qual proporciona anticorpos produzidos através de culturas de linhagem de célula contínuas pode ser usada. Exemplos incluem a técnica de hibridoma, a técnica de trioma, a técnica de hibridoma de células B humanas e a técnica de EBV-hibridoma (veja, por exemplo, Cole (1985) em *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., páginas 77-96).

[00444] Técnicas descritas para a produção de anticorpos com uma única cadeia (veja, por exemplo, Patente U.S. No. 4.946.778) podem ser adaptadas para produzir anticorpos com uma única cadeia aos polipeptídeos da invenção. Alternativamente, camundongos transgênicos podem ser usados para expressar anticorpos humanizados a esses polipeptídeos ou fragmentos dos mesmos.

[00445] Anticorpos gerados contra os polipeptídeos da invenção podem ser usados em seleção de polipeptídeos similares de outros organismos e amostras. Em tais técnicas, polipeptídeos do organismo são contatados com o anticorpo e aqueles polipeptídeos os quais se ligam especificamente ao anticorpo são detectados. Qualquer um dos procedimentos descritos acima pode ser usado para detectar a ligação do anticorpo.

Kits

[00446] A invenção proporciona kits compreendendo as composições,

por exemplo, ácidos nucleicos, cassetes de expressão, vetores, células, polipeptídeos (por exemplo, fitases) e/ou anticorpos da invenção. Os kits também podem conter material instrucional ensinando as metodologias e usos industriais da invenção, conforme descrito aqui.

[00447] Os polipeptídeos da invenção podem também ser usados para gerar anticorpos os quais se ligam especificamente aos polipeptídeos ou fragmentos enzimáticos. Os anticorpos resultantes podem ser usados em procedimentos de cromatografia por imunoafinidade para isolar ou purificar o polipeptídeo ou determinar se o polipeptídeo está presente em uma amostra biológica. Em tais procedimentos, uma preparação de proteína, tal como um extrato, ou uma amostra biológica é contatada com um anticorpo capaz de se ligar especificamente a um dos polipeptídeos de SEQ ID NO: 2, sequências substancialmente idênticas aos mesmos ou fragmentos das sequências precedentes.

[00448] Em procedimentos de imunoafinidade, o anticorpo é preso a um suporte sólido, tal como uma conta ou outra matriz de coluna. A preparação de proteína é colocada em contato com o anticorpo sob condições nas quais o anticorpo se liga especificamente a um dos polipeptídeos de SEQ ID NO: 2, sequências substancialmente idênticas aos mesmos ou fragmentos dos mesmos. Após uma lavagem para remover proteínas não especificamente ligadas, os polipeptídeos especificamente ligados são eluídos.

[00449] As sequências de polinucleotídeo isoladas, sequências polipeptídicas, variantes e mutantes das mesmas podem ser medidas com relação à retenção de uma atividade biológica característica da enzima da presente invenção, por exemplo, em um ensaio para detecção de atividade de fitase enzimática (Food Chemicals Codex, 4^a Ed.). Tais enzimas incluem

formas truncadas de fitase e variantes, tais como variantes com deleção e inserção da sequência polipeptídica conforme apresentado em SEQ ID NO: 2. Essas fitases têm termotolerância. Isto é, a fitase tem uma atividade específica residual de cerca de 90% após tratamento a 70 °C durante 30 minutos e cerca de 50% após tratamento a 75 °C durante 30 minutos. A termotolerância das fitases da invenção é vantajosa ao usar a enzima como um aditivo alimentício, uma vez que o alimento pode ser moldado, granulado ou pelletizado em uma alta temperatura.

[00450] Por exemplo, em um aspecto, a invenção proporciona uma matriz de distribuição de enzima pelletizada comestível e método de uso para distribuição de fitase a um animal, por exemplo, como um suplemento nutricional. A matriz de distribuição de enzima libera prontamente uma enzima fitase, tal como uma tendo a sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 2 ou pelo menos 30 aminoácidos contínuos da mesma, em meios aquosos tais como, por exemplo, o fluido digestivo de um animal. A matriz de distribuição de enzima da invenção é preparada a partir de um veículo comestível granulado selecionado de componentes tais como germe de grão que é consumido de óleo, feno, alfafa, erva-dos-prados, casca de soja, farelo de semente de girassol, farelo de trigo e similares, que dispersam prontamente a enzima recombinante contida nos mesmos em meios aquosos. Em uso, a matriz de distribuição de enzima pelletizada comestível é administrada a um animal para distribuição de fitase ao animal. Substratos baseados em grão adequados podem compreender ou ser derivados de qualquer grão comestível adequado, tais como trigo, milho, soja, sorgo, alfafa, cevada e semelhantes. Um substrato baseado em grão exemplificativo é um substrato baseado em milho. O substrato pode ser derivado de qualquer parte adequada do grão, por exemplo, um germe de grão, aprovado para uso

na alimentação de animais, tal como germe de milho, que é obtido em um processo de moagem a úmido ou a seco. O germe de grão pode compreender germe consumido, o qual é germe de grão do qual o óleo foi expelido, tal como através de compressão ou extração com hexano ou outro solvente. Alternativamente, o germe de grão é extraído no extrator, isto é, o óleo foi removido através de compressão.

[00451] A matriz de distribuição de enzima da invenção está na forma de partículas, péletes ou grânulos plurais distintos. Por "grânulos" entende-se partículas que são comprimidas ou compactadas, tal como através de pelotização, extrusão ou compactação similar para remover água da matriz. Tal compressão ou compactação das partículas também promove a coesão intrapartícula das partículas. Por exemplo, os grânulos podem ser preparados através de pelotização do substrato baseado em grão em um moinho de pélete. Os péletes preparados desse modo são triturados ou esfarelados para granular um tamanho adequado para uso como adjuvante na alimentação de um animal. Uma vez que a matriz é, em si, aprovada para uso em alimentação de animal, ela pode ser usada como um diluente para a distribuição de enzimas em alimentação de animal.

[00452] A matriz de distribuição de enzima pode estar na forma de grânulos tendo um tamanho de grânulo oscilando de cerca de 4 a cerca de 400 mesh (USS); ou cerca de 8 a cerca de 80 mesh; ou cerca de 14 a cerca de 20 mesh. Se o germe de grão é consumido via extração de solvente, uso de um agente de lubricidade, tal como óleo de milho, pode ser necessário no pelotizador, mas tal agente de lubricidade comumente não é necessário se o germe é extraído em um extrator. Em outros aspectos da invenção, a matriz é preparada através de outros processos de compactação ou compressão tais como, por exemplo, por meio de extrusão do substrato baseado em grão

através de uma matriz e trituração do extrudado em um tamanho de grânulo adequado.

[00453] A matriz de distribuição de enzima pode ainda incluir um componente de polissacarídeo como um agente de coesividade para intensificar a coesividade dos grânulos da matriz. Acredita-se que o agente de coesividade proporcione grupos hidroxila adicionais, os quais intensificam a ligação entre as proteínas no grão dentro do grânulo da matriz. Acredita-se ainda que os grupos hidroxila adicionais assim funcionam através de intensificação da ligação de hidrogênio das proteínas ao amido e outras proteínas. O agente de coesividade pode estar presente em qualquer quantidade adequada para intensificar a coesividade dos grânulos da matriz de distribuição de enzima. Agentes de coesividade adequados incluem um ou mais de dextrinas, maltodextrinas, amidos, tal como amido de milho, farinhas, celulósicos, hemicelulósicos e similares. Por exemplo, o percentual de germe de grão e agente de coesividade na matriz (não incluindo a enzima) é de 78% de farelo de germe de milho e 20% em peso de amido de milho.

[00454] Em virtude do fato de a matriz de liberação de enzima da invenção ser feita de materiais biodegradáveis, a matriz pode estar sujeita à deterioração, tal como através de formação de mofo. Para impedir ou inibir tal formação de mofo, a matriz pode incluir um inibidor de mofo, tal como um sal de propionato, o qual pode estar presente em qualquer quantidade suficiente para inibir a formação de mofo da matriz de liberação de enzima, assim, proporcionando uma matriz de distribuição em uma formulação estável que não requer refrigeração.

[00455] A enzima fitase contida na matriz e métodos de distribuição de enzima da invenção é, em um aspecto, uma fitase termotolerante,

conforme descrito aqui, de modo a resistir à inativação da fitase durante fabricação, onde temperaturas elevadas e/ou vapor podem ser empregados para preparar a matriz de distribuição de enzima pelotizada. Durante digestão do alimento contendo a matriz de distribuição de enzima da invenção, fluidos digestivos aquosos causarão a liberação da enzima ativa. Outros tipos de enzimas termotolerantes e suplementos nutricionais que são termotolerantes podem também ser incorporados na matriz de distribuição para liberação sob qualquer tipo de condições aquosas.

[00456] Um revestimento pode ser aplicado às partículas da matriz de enzima da invenção para muitas finalidades diferentes, tal como adicionar um aroma ou suplemento nutricional ao alimento do animal, retardar a liberação de suplementos e enzimas no alimento para animal em condições gástricas e semelhantes. Ou o revestimento pode ser aplicado para obter um objetivo funcional, por exemplo, sempre que é desejável diminuir a liberação da enzima das partículas da matriz ou controlar as condições sob as quais a enzima será liberada. A composição do material de revestimento pode ser tal que ela é seletivamente decomposta por um agente ao qual ela é suscetível (tal como calor, ácido ou base, enzimas ou outros produtos químicos). Alternativamente, dois ou mais revestimentos suscetíveis a diferentes agentes de decomposição podem ser consecutivamente aplicados às partículas da matriz.

[00457] A invenção é também dirigida a um processo para o preparo de uma matriz de liberação de enzima. De acordo com a invenção, o processo compreende fornecimento de partículas plurais distintas de um substrato baseado em grão em um tamanho de partícula adequado para uso como uma matriz de liberação de enzima, em que as partículas compreendem uma enzima fitase da invenção. O processo pode incluir

compactação ou compressão das partículas de matriz de liberação de enzima em grânulos, o que pode ser realizado através de pelletização. O inibidor de mofo e agente de coesividade, quando usados, podem ser adicionados em qualquer momento adequado e podem ser misturados com o substrato baseado em grão nas proporções desejadas antes de pelletização do substrato baseado em grão. O teor de umidade no alimento no moinho de pélete pode estar nas faixas apresentadas acima com relação ao teor de umidade no produto acabado ou cerca de 14% a 15% ou cerca de 10% a 20%. A umidade pode ser adicionada ao estoque de alimentação na forma de uma preparação aquosa da enzima para levar o estoque de alimentação a esse teor de umidade. A temperatura no moinho de pélete pode ser levada para cerca de 82 °C com vapor. O moinho de pélete pode ser operado sob quaisquer condições que conferem força suficiente ao estoque de alimentação para proporcionar péletes. O processo de pelletização em si é um processo de custo eficaz para remoção de água da composição contendo enzima.

[00458] Em um aspecto, o moinho de pélete é operado com uma matriz de 0,3175 cm por 5,08 cm (1/8 polegada por 2 polegadas) em uma pressão de 45,36 kg/min (100 libras/min) a 82°C para proporcionar péletes os quais são, então, esfareladas em um esfarelador de moinho de pélete para proporcionar partículas plurais distintas tendo um tamanho de partícula capaz de passar através de uma peneira de 8 mesh, mas sendo retidas em uma peneira de 20 mesh.

[00459] As fitases termotolerantes descritas aqui podem ter temperaturas altas ótimas e podem ter alta resistência ao calor ou tolerância ao calor. Assim, as fitases da invenção podem realizar reações enzimáticas em temperaturas normalmente consideradas acima do ótimo. As fitases da invenção também podem realizar reações enzimáticas após serem expostas à

altas temperaturas (termotolerância sendo a capacidade de reter atividade enzimática em temperaturas onde a fitase do tipo selvagem é ativa após ser previamente exposta à altas temperaturas, mesmo se a alta temperatura pode inativar ou diminuir a atividade da enzima, veja também definição de termotolerância, acima). O gene que codifica a fitase de acordo com a presente invenção pode ser usado na preparação de fitases (por exemplo, usando GSSM conforme descrito aqui) tendo características diferentes daquelas da fitase de SEQ ID NO: 2 (em termos de pH ótimo, temperatura ótima, resistência ao calor, estabilidade a solventes, atividade específica, afinidade por substrato, capacidade de secreção, taxa de tradução, controle de transcrição e similares). Além disso, os polinucleotídeos da invenção podem ser empregados para seleção de fitases variantes preparadas através dos métodos descritos aqui para determinar aquelas tendo uma atividade desejada, tal como termoestabilidade ou termotolerância aperfeiçoada ou modificada. Por exemplo, a Patente U.S. No. 5.830.732 descreve um ensaio de seleção para determinação da termotolerância de uma fitase.

[00460] Um exemplo in vitro de tal ensaio de seleção é o seguinte ensaio para a detecção de atividade de fitase: a atividade de fitase pode ser medida através de incubação de 150 µl da preparação de enzima com 600 µl de fitato de sódio a 2 mM em tampão de Tris HCl a 100 mM, pH de 7,5, suplementado com CaCl₂ a 1 mM durante 30 minutos a 37 °C. Após incubação, a reação é cessada através da adição de 750 µl de ácido tricloroacético a 5%. O fosfato liberado foi medido contra um padrão de fosfato preparado espectrofotometricamente a 700 nm após adição de 1500 µl do reagente colorido (4 volumes de molibdato de amônio a 1,5% em ácido sulfúrico a 5,5% e 1 volume de 2,7% de sulfato ferroso; Shimizu, 1992). Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade

de enzima requerida para liberar um μmol de Pi por min sob as condições do ensaio. A atividade específica pode ser expressa em unidades de atividade enzimática por mg de proteína. A enzima da presente invenção tem atividade enzimática com relação à hidrólise de fitato em inositol e fosfato livre.

[00461] Em um aspecto, a presente invenção proporciona um método de hidrólise de fitato compreendido de contato do fitato com uma ou mais das novas moléculas de fitase divulgadas aqui (por exemplo, proteínas tendo as modificações específicas de SEQ ID NO: 2). Consequentemente, a invenção proporciona um método para catalisar a hidrólise de fitato em inositol e fosfato livre, com liberação de minerais do complexo de ácido fítico. O método inclui contato do substrato de fitato com uma quantidade eficaz para degradação de uma enzima da invenção. O termo quantidade "eficaz para degradação" se refere à quantidade de enzima a qual é requerida para degradar pelo menos 50% do fitato, quando comparado com o fitato não contatado com a enzima. 80% do fitato podem ser degradados.

[00462] Em outro aspecto, a invenção proporciona um método para hidrólise de ligações de fosfo-monoéster no fitato. O método inclui administração de uma quantidade eficaz de moléculas de fitase da invenção para proporcionar inositol e fosfato livre. Em um aspecto, uma quantidade "eficaz" se refere à quantidade de enzima a qual é requerida para hidrolisar pelo menos 50% das ligações de fosfo-monoéster, quando comparado com o fitato não contatado com a enzima. Em um aspecto, pelo menos 80% das ligações são hidrolisadas.

[00463] Em um aspecto particular, quando desejado, as moléculas de fitase podem ser usadas em combinação com outros reagentes, tais como outros catalisadores; de forma a realizar alterações químicas (por exemplo, hidrólise) nas moléculas de fitato e/ou em outras moléculas da(s) fonte(s) de

substrato. De acordo com esse aspecto, as moléculas de fitase e o(s) reagente(s) adicional(is) não inibirão uns aos outros. As moléculas de fitase e o(s) reagente(s) adicional(is) podem ter um efeito aditivo global ou, alternativamente, moléculas de fitase e o(s) reagente(s) adicional(is) podem ter um efeito sinérgico global.

[00464] Fontes relevantes das moléculas de fitato de substrato incluem gêneros alimentícios, gêneros alimentícios potenciais, subprodutos de gêneros alimentícios (subprodutos in vitro e subprodutos in vivo, por exemplo, os produtos de reação ex vivo e produtos de excrementos animais), precursores de gêneros alimentícios e qualquer outra fonte de material de fitato.

[00465] Em um aspecto não-limitativo, a fitase recombinante pode ser consumida por organismos e reter atividade quando de consumo. Em outra exemplificação, abordagens transgênicas podem ser usadas para obter expressão da fitase recombinante - por exemplo, de um modo controlado (métodos estão disponíveis para controle de expressão de moléculas transgênicas de maneira tempo-específica e tecido-específica).

[00466] Em um aspecto, a atividade de fitase no material fonte (por exemplo, uma fonte de planta transgênica ou hospedeiro procariota recombinante) pode ser aumentada quando de consumo; esse aumento na atividade pode ocorrer, por exemplo, quando de conversão de uma molécula de fitase precursora em uma pró-forma até uma enzima significativamente mais ativa em uma forma mais madura, onde a referida conversão pode resultar, por exemplo, da ingestão e digestão da fonte de fitase. Hidrólise do substrato de fitato pode ocorrer em qualquer momento quando de contato da fitase com o fitato; por exemplo, isso pode ocorrer antes de ingestão ou após ingestão ou antes e após ingestão do substrato ou da enzima ou ambos.

Adicionalmente, é apreciado que o substrato de fitato pode ser contatado com - além da fitase - um ou mais reagentes adicionais, tal como outra enzima, a qual pode também ser aplicada diretamente ou após purificação de seu material fonte.

[00467] É apreciado que o(s) material(is) fonte de fitase pode(m) ser contatado(s) diretamente com o(s) material(is) fonte de fitato; por exemplo, quando de trituração ou mastigação in vitro ou in vivo de qualquer um ou ambos da(s) fonte(s) de fitase e de material(is) fonte ou a enzima fitase e o substrato fitato podem ser purificados do(s) material(is) fonte antes de contato da enzima fitase com o substrato fitato. É apreciado que uma combinação de reagentes purificados e não-purificados - incluindo enzima(s) ou substrato(s) ou ambos - pode ser usada.

[00468] É apreciado que mais de um material fonte pode ser usado como uma fonte de atividade de fitase. Isso é útil como uma forma de obter uma liberação sincronizada de reagente(s) de material(is) fonte, onde a liberação de diferentes reagentes de seus materiais fonte ocorre diferencialmente, por exemplo, à medida que os materiais fonte ingeridos são digeridos in vivo ou à medida que os materiais fonte são processados em aplicações in vitro. O uso de mais de um material fonte de atividade de fitase é também útil para obter atividades de fitase sob uma faixa de condições e flutuações das mesmas, que podem ser encontradas - tal como uma faixa de valores de pH, temperaturas, salinidades e intervalos de tempo - por exemplo, durante diferentes etapas de processamento de uma aplicação. O uso de diferentes materiais fonte também é útil de forma a obter diferentes reagentes, conforme exemplificado por uma ou mais formas ou isômeros de fitase e/ou fitato e/ou outros materiais.

[00469] É apreciado que um único material fonte, tal como uma

espécie de planta transgênica (ou partes de planta da mesma) pode ser um material fonte de fitase e fitato; e que enzimas e substratos podem ser diferencialmente compartimentalizados dentro da referida única fonte - por exemplo, secretados vs. não-secretados, diferencialmente expressos e/ou tendo diferentes abundâncias em diferentes partes ou órgãos ou tecidos da planta ou em compartimentos subcelulares dentro da mesma parte ou órgão ou tecido de planta. Purificação das moléculas de fitase contidas nos mesmos pode compreender isolamento e/ou processamento adicional de uma ou mais partes ou órgãos ou tecidos ou compartimentos subcelulares de planta desejáveis.

[00470] Em um aspecto, a presente invenção proporciona um método de catálise de reações *in vivo* e/ou *in vitro* usando sementes contendo quantidades intensificadas de enzimas. O método compreende adição de sementes transgênicas, que não são do tipo selvagem, por exemplo, em uma forma triturada, a uma mistura de reação e deixar as enzimas nas sementes aumentar a taxa de reação. Através de adição direta das sementes à mistura de reação, o método proporciona uma solução ao processo mais caro e trabalhoso de extração e purificação da enzima. Métodos de tratamento são também proporcionados pelos quais, a um organismo carecendo de um suprimento suficiente de uma enzima, é administrada a enzima na forma de uma ou mais espécies de planta, por exemplo, espécies de planta transgênica, contendo quantidades intensificadas da enzima. Detalhes adicionais com relação a essa abordagem estão na literatura pública e/ou são conhecidos por aqueles versados na técnica. Em uma exemplificação não-limitativa particular, tal literatura publicamente disponível inclui a Patente U.S. No. 5.543.576 (Van Ooijen e outros) e Patente U.S. No. 5.714.474 (Van Ooijen e outros), embora essas referências não ensinem as moléculas

da invenção do presente pedido e, antes, ensinam o uso de fitases fúngicas.

[00471] Em um aspecto, as presentes moléculas de fitase são úteis para a geração de formas de vida recombinantes do sistema digestivo (ou micróbios ou flora) e para a administração das referidas formas de vida recombinantes do sistema digestivo a animais. A administração pode ser opcionalmente realizada sozinha ou em combinação com outras enzimas e/ou com outras formas de vida que podem proporcionar atividade enzimática em um sistema digestivo, onde as referidas outras enzimas e referidas formas de vida podem ser recombinantes ou de outro modo. Por exemplo, a administração pode ser realizada em combinação com bactérias xilanolíticas.

[00472] Em um aspecto, a presente invenção proporciona um método para maceração de sementes de milho ou sorgo em água morna contendo dióxido de enxofre na presença de um preparado enzimático compreendendo uma ou mais enzimas de degradação de fitina, por exemplo, em uma quantidade tal que a fitina presente no milho ou sorgo é substancialmente degradada. A preparação enzimática pode compreender fitase e/ou fosfatase ácida e opcionalmente outras enzimas de degradação de material vegetal. O tempo de maceração pode ser de 12 a 18 horas. A maceração pode ser interrompida por uma etapa de moagem intermediária, reduzindo o tempo de maceração. Em um aspecto, sementes de milho ou sorgo são maceradas em água morna contendo dióxido de enxofre na presença de um preparado enzimático incluindo uma ou mais enzimas de degradação de fitina, tais como fitase e fosfatases ácidas, para eliminar ou reduzir grandemente o ácido fítico e os sais de ácido fítico. Detalhes adicionais com relação a essa abordagem estão na literatura pública e/ou são conhecidos por aqueles versados, por exemplo, Patente U.S. No. 4.914.029, (Caransa e outros) e EP

0321004 (Vaara e outros).

[00473] Em um aspecto, a presente invenção proporciona um método para obter uma massa de pão tendo propriedades físicas desejáveis, tais como não-aderência e elasticidade e um produto de pão de qualidade superior, tal como um volume específico, compreendendo adição de moléculas de fitase à massa do pão. Em um aspecto, as moléculas de fitase da presente invenção são adicionadas a uma preparação de massa de pão de trabalho que é subsequentemente transformada e assada. Detalhes adicionais com relação a essa abordagem estão na literatura pública e/ou são conhecidos por aqueles versados, por exemplo, JP 03076529 (Hara e outros).

[00474] Em um aspecto, a presente invenção proporciona um método para produzir gêneros alimentícios de soja aperfeiçoados. Sojas são combinadas com moléculas de fitase da presente invenção para remover o ácido fítico das sojas, assim, produzindo gêneros alimentícios de soja que são aperfeiçoados com relação a seu suprimento de nutrientes vestigiais essenciais para consumo por organismos e quanto à sua digestibilidade de proteínas. Em um aspecto, na produção de leite de soja, as moléculas de fitase da presente invenção são adicionadas a ou mantidas em contato com sojas de forma a reduzir o teor de ácido fítico. Em uma exemplificação não-limitativa, o processo de aplicação pode ser acelerado através de agitação do leite de soja junto com a enzima sob aquecimento ou conduzindo uma reação do tipo mistura em um recipiente de agitação usando uma enzima imobilizada. Detalhes adicionais com relação a essa abordagem estão na literatura pública e/ou são conhecidos por aqueles versados, por exemplo, JP 59166049 (Kamikubo e outros).

[00475] Em um aspecto, a presente invenção proporciona um método de produção de um produto misturado para água potável ou alimento para

animal na forma fluida e o qual compreende uso de misturas de minerais e misturas de vitaminas e também novas moléculas de fitase da presente invenção. Em um aspecto, é obtida uma mistura corretamente dosada e composta de nutrientes necessários para o consumo por um organismo sem qualquer risco de precipitação e destruição de minerais/vitaminas importantes, ao mesmo tempo em que utilização ótima é feita do fosfato ligado à fitina no alimento. Detalhes adicionais com relação a essa abordagem estão na literatura pública e/ou são conhecidos por aqueles versados, por exemplo, EP 0772978 (Bendixen e outros).

[00476] É apreciado que as moléculas de fitase da presente invenção também podem ser usadas para produzir outros gêneros alimentícios bebíveis não-alcoólicos (ou bebidas) baseado no uso de mofos e/ou grãos e/ou em outras plantas. Esses gêneros alimentícios bebíveis incluem licores, vinhos, bebidas alcoólicas misturadas (por exemplo, coolers de vinho, outros cafés alcoólicos, tais como cafés Irlandeses, etc.), cervejas, quase-cervejas, sucos, extratos, homogenatos e purês. Em um aspecto, as moléculas de fitase presentemente divulgadas são usadas para gerar versões transgênicas dos mofos e/ou grãos e/ou outros ingredientes adicionais no processo de fabricação e/ou no teor final de tais gêneros alimentícios bebíveis. Detalhes adicionais com relação a essa abordagem estão na literatura pública e/ou são conhecidos por aqueles versados.

[00477] Em um aspecto, a presente invenção proporciona um meio para obter saquê refinado tendo uma quantidade reduzida de fitina e um teor aumentado de inositol. Tal saquê pode ter - através de efeitos psicogênicos e/ou diretos - uma ação preventiva sobre doença hepática, arteriosclerose e outras doenças. Em um aspecto, um saquê é produzido a partir de arroz Koji multiplicando um mofo de arroz Koji tendo alta atividade de fitase como

uma matéria prima. É apreciado que as moléculas de fitase da presente invenção podem ser usadas para produzir um modo útil com atividade intensificada (por exemplo, um mofo transgênico) e/ou adicionadas exogenamente para aumentar os efeitos de um modo Koji. A cepa é adicionada ao arroz em ebulição e Koji é produzido através de um procedimento convencional. Em uma exemplificação, o Koji preparado é usado, o arroz integral é preparado em dois estágios e saquê é produzido em uma temperatura constante para saquê de 15 oC para proporcionar o saquê refinado alvo tendo uma quantidade reduzida de fitina e uma quantidade aumentada de inositol. Detalhes adicionais com relação a essa abordagem estão na literatura pública e/ou são conhecidos por aqueles versados, por exemplo, JP 06153896 (Soga e outros) e JP 06070749 (Soga e outros).

[00478] Em um aspecto, a presente invenção proporciona um método para obter um absorvefaciente capaz de promover a absorção de minerais, incluindo cálcio ingerido, sem ser digerido pelos sucos gástricos ou sucos intestinais em um baixo custo. Em um aspecto, o absorvefaciente mineral contém um hidrolisato parcial de ácido fítico como um ingrediente ativo. Um hidrolisato parcial do ácido fítico pode ser produzido através de hidrólise do ácido fítico ou seus sais usando as novas moléculas de fitase da presente invenção. O tratamento com as moléculas de fitase pode ocorrer sozinho e/ou em um tratamento combinado (para inibir ou aumentar o efeito final) e é seguido por inibição de hidrólise dentro de uma faixa de modo a não liberar todos os radicais fosfato. Detalhes adicionais com relação a essa abordagem estão na literatura pública e/ou são conhecidos por aqueles versados, por exemplo, JP 04270296 (Hoshino).

[00479] Em um aspecto, a presente invenção proporciona um método (e produtos do mesmo) para produzir uma composição enzimática tendo

uma atividade de hidrólise de fitato aditiva ou sinérgica; a referida composição compreende as novas moléculas de fitase da presente invenção e um ou mais reagentes adicionais para obter uma composição que é útil para um tratamento combinado. Em um aspecto, o tratamento combinado da presente invenção é obtido com o uso de pelo menos duas fitases de diferentes especificidades posicionais, isto é, quaisquer combinações de 1-, 2-, 3-, 4-, 5- e 6-fitases. Combinando fitases de diferentes especificidades posicionais, um efeito aditivo ou sinérgico é obtido. Composições tais como alimento e ração ou aditivos alimentícios e para ração compreendendo tais fitases em combinação são também incluídas na presente invenção, assim como processos para seu preparo. Detalhes adicionais com relação a essa abordagem estão na literatura pública e/ou são conhecidos por aqueles versados na técnica, por exemplo, WO 30681 (Ohmann e outros).

[00480] Em outro aspecto, o tratamento combinado da presente invenção é obtido com o uso de uma fosfatase ácida tendo atividade de hidrólise de fitato em um pH de 2,5, em uma baixa proporção correspondendo a um perfil de atividade em pH de 2,5:5,0 de cerca de 0,1:1,0 a 10:1 ou de cerca de 0,5:1,0 a 5:1 ou de cerca de 0,8:1,0 a 3:1 ou de cerca de 0,8:1,0 a 2:1. A composição enzimática pode mostrar uma maior eficiência de hidrólise de fitato sinérgica através de tratamento térmico. A composição enzimática é útil no tratamento de gêneros alimentícios (alimentos bebíveis e sólidos, ração e produtos de forragem) para melhorar a hidrólise de fitato. Detalhes adicionais ou protocolos alternativos com relação a essa abordagem estão na literatura pública e/ou são conhecidos por aqueles versados, por exemplo, Patente U.S. No. 5.554.399 (Vanderbeke e outros) e Patente U.S. No. 5.443.979 (Vanderbeke e outros), ensinando o uso de fitases fúngicas (em particular *Aspergillus*).

[00481] Em outro aspecto, a presente invenção proporciona um método (e produtos do mesmo) para produzir uma composição compreendendo a presente nova enzima de atuação sobre fitato em combinação com uma ou mais enzimas adicionais que atuam sobre polissacarídeos. Tais polissacarídeos podem ser selecionados do grupo consistindo em arabinanos, frutanos, fucanos, galactanos, galacturonanos, glicanos, mananos, xilanos, levano, fucoidano, carragenina, galactocarolose, pectina, ácido péctico, amilose, pululano, glicogênio, amilopectina, celulose, carboximetil celulose, hidróxipropil metil celulose, dextrano, pustulana, quitina, agarose, queratana, condroitina, dermatana, ácido hialurônico, ácido algínico e polissacarídeos contendo pelo menos uma aldose, cetose, ácido ou amina selecionados do grupo consistindo em eritrose, treose, ribose, arabinose, xilose, lixose, alose, altrose, glicose, manose, gulose, idose, galactose, talose, eritrulose, ribulose, xilulose, psicose, frutose, sorbose, tagatose, ácido glucurônico, ácido glucônico, ácido glucárico, ácido galacturônico, ácido manurônico, glicosamina, galactosamina e ácido neuramínico.

[00482] Em um aspecto, a presente invenção proporciona um método (e produtos do mesmo) para produzir uma composição tendo uma atividade de hidrólise de fitato sinérgica compreendendo uma ou mais das novas moléculas de fitase da presente invenção, uma celulase (pode também incluir uma xilanase), opcionalmente uma protease e opcionalmente um ou mais reagentes adicionais. Em aspectos alternativos, tais tratamentos combinados são úteis no tratamento de gêneros alimentícios, produtos de madeira, tais como produtos de papel e como soluções e sólidos de limpeza.

[00483] Em um aspecto, as fitases da invenção são úteis em combinação com componentes de celulose. Sabe-se que celulasas de muitas

bactérias celulolíticas são organizadas em complexos multienzimáticos distintos, denominados celulosomas. As múltiplas subunidades dos celulosomas são compostas de numerosos domínios funcionais, os quais interagem uns com os outros e com o substrato celulósico. Uma dessas subunidades compreende uma nova classe distinta de polipeptídeo de base não catalítico, o qual integra seletivamente as várias subunidades de celulase e xilanase no complexo coeso. Aplicação inteligente de híbridos de celulosoma e construtos quiméricos de domínios celulosômicos permitiria melhor uso da biomassa celulósica e pode oferecer uma ampla faixa de novas aplicações em pesquisa, medicina e indústria.

[00484] Em um aspecto, as fitases da invenção são úteis - quer sozinhas ou em tratamentos combinados - em áreas de bioformação de polpa e biobranqueamento, onde uma redução no uso de produtos químicos prejudiciais ao meio ambiente tradicionalmente usados na indústria de polpa e papel é desejada. Tratamento da água residual representa outra vasta área de aplicação onde foi mostrado que enzimas biológicas são eficazes não apenas na remoção de cor, mas também na bioconversão de substâncias potencialmente nocivas em bioprodutos úteis.

[00485] Em um aspecto, as fitases da invenção são úteis para a geração de formas de vida que podem proporcionar pelo menos uma atividade enzimática - quer sozinhas ou em tratamentos combinados - no tratamento de sistemas digestivos de organismos. Organismos particularmente relevantes a serem tratados incluem organismos não-ruminantes, embora organismos ruminantes também possam se beneficiar de tal tratamento. Especificamente, é apreciado que essa abordagem pode ser realizada sozinha ou em combinação com outras moléculas biológicas (por exemplo, xilanases) para gerar um hospedeiro recombinante que expressa

uma pluralidade de moléculas biológicas. Também é apreciado que a administração das presentes moléculas de fitase e/ou hospedeiros recombinantes expressando as presentes moléculas de fitase pode ser realizada sozinha ou em combinação com outras moléculas biológicas e/ou formas de vida que podem proporcionar atividades enzimáticas em um sistema digestivo - onde as referidas outras enzimas e referidas formas de vida podem ser recombinantes ou de outro modo. Por exemplo, a administração pode ser realizada em combinação com bactérias xilanolíticas.

[00486] Por exemplo, além de fitato, muitos organismos são também incapazes de digerir hemiceluloses. Hemiceluloses ou xilanos são os principais componentes (35%) dos materiais de planta. Para animais ruminantes, cerca de 50% dos xilanos dietéticos são degradados, mas apenas pequenas quantidades de xilanos são degradadas no intestino inferior de animais não ruminantes e seres humanos. No rúmen, as principais espécies xilanolíticas são *Butyrivibrio fibrisolvens* e *Bacteroides ruminicola*. No cólon humano, *Bacteroides ovatus* e *Bacteroides fragilis* subespécies "a" são as principais bactérias xilanolíticas. Xilanos são quimicamente complexos e sua degradação requer múltiplas enzimas. Expressão dessas enzimas por bactérias no intestino varia grandemente entre espécies. *Butyrivibrio fibrisolvens* compõem bactérias extracelulares, mas espécies *Bacteróides* têm atividade de xilanase célula-ligada. A caracterização bioquímica de enzimas xilanolíticas a partir de bactérias do intestino não foi feita completamente. Um gene de xilosidase foi clonado de *B. fibrosolvens*. Os dados de hibridizações de DNA usando um gene de xilanase clonado de *B. fibrosolvens* indica que esse gene pode estar presente em outras cepas de *B. fibrosolvens*. Uma xilanase clonada de *Bact. ruminicola* foi transferida para e altamente expressa em *Bact. fragilis* e *Bact. uniformis*. Genes de

arabinosidase e xilosidase de *Bact. ovatus* foram clonados e ambas as atividades parecem ser catalisadas por uma única nova enzima bifuncional.

[00487] Em um aspecto, as fitases da invenção são úteis para 1) transferência para um hospedeiro adequado (tal como *Bact. fragilis* ou *Bact. uniformis*); 2) obtenção de expressão adequada em um hospedeiro recombinante resultante; e 3) administração do referido hospedeiro recombinante a organismos para melhorar a capacidade dos organismos tratados de degradar fitato. Pesquisa contínua nas áreas de genética e bioquímica proporcionará conhecimento e "insights" para manipulação de digestão a nível de intestino e compreensão aperfeiçoada de digestão de fibras colônicas.

[00488] Detalhes adicionais ou protocolos alternativos com relação a essa abordagem estão na literatura pública e/ou são conhecidos por aqueles versados, por exemplo, a invenção pode incorporar procedimentos conforme descrito na Patente U.S. No. 5.624.678 (Bedford e outros), Patente U.S. No. 5.683.911 (Bodie e outros), Patente U.S. No. 5.720.971 (Beauchemin e outros), Patente U.S. No. 5.759.840 (Sung e outros), Patente U.S. No. 5.770.012 (Cooper), Patente U.S. No. 5.786.316 (Baeck e outros), Patente U.S. No. 5.817.500 (Hansen e outros.).

[00489] A presente invenção ensina que as moléculas de fitase da presente invenção podem ser adicionadas ao(s) reagente(s) divulgado(s) de forma a obter preparados tendo uma atividade de fitase adicional. Em um aspecto, reagente(s) e as moléculas de fitase adicionais não inibirão uns aos outros. Em um aspecto, o(s) reagente(s) e as moléculas de fitase adicionais podem ter um efeito aditivo global. Em um aspecto, o(s) reagente(s) e as moléculas de fitase adicionais podem ter um efeito sinérgico global.

[00490] Em um aspecto, a presente invenção proporciona um método

(e produtos do mesmo) para intensificação da utilização de fósforo de fitato e tratamento e prevenção de discondroplasia tibial em animais, particularmente aves, através de administração, aos animais, de uma composição de ração contendo um derivado de vitamina D3 hidroxilado. O derivado de vitamina D3 pode ser administrado aos animais na ração contendo níveis reduzidos de cálcio e fósforo para intensificação da utilização de fósforo de fitato. Consequentemente, o derivado de vitamina D3 pode ser administrado em combinação com as novas moléculas de fitase da presente invenção para intensificação adicional da utilização de fósforo de fitato. Detalhes adicionais ou protocolos alternativos com relação a essa abordagem estão na literatura pública e/ou são conhecidos por aqueles versados, por exemplo, Patente U.S. No. 5.516.525 (Edwards e outros) e Patente U.S. No. 5.366.736 (Edwards e outros), Patente U.S. No. 5.316.770 (Edwards e outros).

[00491] Em um aspecto, a presente invenção proporciona um método (e produtos do mesmo) para obter um gênero alimentício que 1) compreende fitina que é facilmente absorvida e utilizada em uma forma de inositol no corpo de um organismo; 2) que é capaz de reduzir o fósforo em matéria excrementária; e 3) que, consequentemente, é útil para melhorar a poluição ambiental. O referido gênero alimentício é compreendido de uma mistura de um grão contendo fitina, um micro-organismo que produz ácido láctico e uma nova molécula de fitase da presente invenção. Em um aspecto, o referido gênero alimentício é produzido através de composição de um grão contendo fitina (por exemplo, farelo de arroz) com um grupo microbiano eficaz tendo uma propriedade acidofílica, produção de ácido láctico, sem produção de ácido butírico, livre de patogenicidade e uma fitase. Exemplos de um grupo microbiano eficaz incluem, por exemplo, *Streptomyces* sp.

(American Type Culture Collection No. ATCC 3004) pertencendo ao grupo de actinomicete e *Lactobacillus* sp. (IFO 3070) pertencendo ao grupo de lactobacilos.

[00492] Uma quantidade exemplificativa de um grupo microbiano eficaz é 0,2% em peso em termos de peso do corpo bacteriano, baseado em um material de grão. Em um aspecto, a quantidade da adição da fitase é cerca de 1-2% em peso baseado na fitina no material de grão. Detalhes adicionais ou protocolos alternativos com relação a essa abordagem estão na literatura pública e/ou são conhecidos por aqueles versados, por exemplo, JP 08205785 (Akahori e outros).

[00493] Em um aspecto, a presente invenção proporciona um método para melhorar a solubilidade de proteínas vegetais. Mais especificamente, a invenção se refere a métodos para a solubilização de proteínas em fontes de proteína vegetal, métodos os quais compreendem tratamento da fonte de proteína vegetal com uma quantidade eficiente de uma ou mais enzimas fitase da invenção e tratamento da fonte de proteína vegetal com uma quantidade eficiente de uma ou mais enzimas proteolíticas. Em outro aspecto, a invenção proporciona aditivos para ração para animais compreendendo uma fitase da invenção e uma ou mais enzimas proteolíticas. Detalhes adicionais ou protocolos alternativos com relação a essa abordagem estão na literatura pública e/ou são conhecidos por aqueles versados, por exemplo, EP 0756457 (WO 9528850 A1) (Nielsen e Knap).

[00494] Em um aspecto, a presente invenção proporciona um método de produção de uma preparação de proteína de planta compreendendo dispersão de materiais fonte de proteína vegetal em água em um pH na faixa de 2 a 6 e mistura das moléculas de fitase da presente invenção na mesma. O extrato ácido contendo proteína solúvel é separado e seco para proporcionar

uma proteína sólida de caráter desejado. Uma ou mais proteases podem também ser usadas para melhorar as características da proteína. Detalhes adicionais ou protocolos alternativos com relação a essa abordagem estão na literatura pública e/ou são conhecidos por aqueles versados, por exemplo, Patente U.S. No. 3.966.971.

[00495] Em um aspecto, a presente invenção proporciona um método (e produtos do mesmo) para ativar fósforo inerte no solo e/ou composto, para melhorar a taxa de utilização de um composto de nitrogênio e suprimir a propagação de mofos patogênicos através da adição de três reagentes, fitase, saponina e quitosano, ao composto.

[00496] Em um aspecto, o método pode compreender tratamento do composto através de 1) adição de micro-organismos contendo fitase ao meio, por exemplo, hospedeiros recombinantes que superexpressam as novas moléculas de fitase da presente invenção, por exemplo, a 100 ml de meio/100 kg de composto úmido; 2) alternativamente, também adição de uma fonte vegetal contendo fitase - tal como farelo de trigo - por exemplo, a 0,2 a 1 kg/100 kg de composto úmido; 3) adição de uma fonte contendo saponina - tal como turfa, artemísias e plantas yucca - por exemplo, a 0,5 a 3,0 g/kg; e) adição de materiais contendo quitosana - tais como cascas pulverizadas de camarões, caranguejos, etc. - por exemplo, a 100 a 300 g/kg de composto úmido.

[00497] Em um aspecto, fontes recombinantes dos três reagentes, fitase, saponina e quitosana, são usadas. Detalhes adicionais ou protocolos alternativos com relação a essa abordagem estão na literatura pública e/ou são conhecidos por aqueles versados na técnica, por exemplo, JP 07277865 (Toya Taisuke).

[00498] Em alguns casos, pode ser vantajoso distribuir e expressar

uma sequência de fitase da invenção localmente (por exemplo, dentro de um tecido ou tipo de célula particular). Por exemplo, expressão local de uma enzima fitase ou digestiva no intestino de um animal auxiliará na digestão e captação, por exemplo, de fitato e fósforo, respectivamente. A sequência de ácido nucleico pode ser diretamente distribuída às glândulas salivares, tecido e células e/ou às células epiteliais que revestem o intestino, por exemplo. Tais métodos de distribuição são conhecidos na técnica e incluem eletroporação, vetores virais e captação direta de DNA. Qualquer polipeptídeo tendo atividade de fitase pode ser utilizado nos métodos da invenção (por exemplo, aqueles especificamente descritos sob a subseção 6.3.18, bem como aqueles descritos em outras seções da invenção).

[00499] Por exemplo, um construto de ácido nucleico da presente invenção compreenderá moléculas de ácido nucleico em uma forma adequada para captação em células-alvo dentro de um tecido hospedeiro. Os ácidos nucleicos podem estar na forma de moléculas de DNA ou RNA nu, onde as moléculas podem compreender um ou mais genes estruturais, um ou mais genes regulatórios, fitas antissenso, fitas capazes de formação de tripla ou similar. Comumente, o construto de ácido nucleico incluirá pelo menos um gene estrutural sob o controle transcricional e traducional de uma região regulatória adequada. Mais usualmente, os construtos de ácido nucleico da presente invenção compreenderão ácidos nucleicos incorporados em um veículo de distribuição para melhorar a eficiência de transfecção, em que o veículo de distribuição será disperso dentro de partículas maiores compreendendo um material excipiente hidrofílico seco.

[00500] Um de tais veículos de distribuição compreende vetores virais, tais como retrovírus, adenovírus e vírus adeno-associados, os quais foram inativados para prevenir autorreplicação, mas os quais mantêm a

capacidade viral nativa de se ligar a uma célula hospedeira alvo, distribuir material genético no citoplasma da célula hospedeira alvo e promover a expressão de genes estruturais ou outros os quais foram incorporados na partícula. Vetores retrovirais adequados para transferência de gene mediada são descritos em Kahn e outros (1992) *Circ. Res.* 71: 1508-1517. Uma distribuição de gene adenoviral adequada é descrita em Rosenfeld e outros (1991) *Science* 252: 431-434. Sistemas de distribuição retrovirais e adenovirais são descritos em Friedman (1989) *Science* 244: 1275-1281.

[00501] Um segundo tipo de veículo de distribuição de ácido nucleico compreende vesículas de transfecção lipossômicas, incluindo construtos lipossômicos aniônicos e catiônicos. O uso de lipossomas aniônicos requer que os ácidos nucleicos estejam encerrados dentro do lipossoma. Lipossomas catiônicos não requerem encerramento em ácido nucleico e, antes, podem ser formados através de simples mistura dos ácidos nucleicos e lipossomas. Os lipossomas catiônicos se ligam avidamente às moléculas de ácido nucleico negativamente carregadas, incluindo DNA e RNA, para proporcionar complexos os quais fornecem eficiência de transfecção razoável em muitos tipos de célula. Veja Farhood e outros (1992) *Biochem. Biophys. Acta.* 1111: 239-246. Um material exemplificativo para formação de vesículas lipossômicas é lipofectina, a qual é composta de uma mistura equimolar de dioleilfosfatidil etanolamina (DOPE) e dioleiloxipropil trietilamônio (DOTMA), conforme descrito em Felgner e Ringold (1989) *Nature* 337: 387-388.

[00502] Também é possível combinar esses dois tipos de sistemas de distribuição. Por exemplo, Kahn e outros (1992), *supra*, ensinam que um vetor retroviral pode ser combinado com uma vesícula de DEAE-dextrana catiônica para intensificar adicionalmente a eficiência de transformação.

Também é possível incorporar proteínas nucleares nas vesículas de distribuição virais e/ou lipossômicas para melhorar adicionalmente as eficiências de transfecção. Veja Kaneda e outros (1989) Science 243: 375-378.

[00503] Em outro aspecto, um auxiliar digestivo contendo uma enzima, quer como o único ingrediente ativo ou em combinação com um ou mais de outros agentes e/ou enzimas, é proporcionado. O uso de enzimas e outros agentes em auxiliares digestivos de animais de criação ou domesticados não apenas melhora a saúde e expectativa de vida do animal, mas também auxilia no aumento da saúde da criação e na produção de gêneros alimentícios a partir da criação.

[00504] A invenção também pode usar rações para criação (por exemplo, determinadas rações para ave) que são altamente suplementadas com numerosos minerais (por exemplo, fósforo inorgânico), enzimas, fatores de crescimento, fármacos e outros agentes para distribuição à criação. Esses suplementos substituem muitas das calorias e nutrientes naturais presentes no grão, por exemplo. Reduzindo ou eliminando o suplemento de fósforo inorgânico e outros suplementos (por exemplo, sais minerais vestigiais, fatores de crescimento, enzimas, antibióticos) da ração em si, a ração é capaz de levar mais nutriente e energia. Consequentemente, a dieta restante conteria mais energia utilizável. Por exemplo, dietas de farelo de semente oleosa-grão geralmente contêm cerca de 3.200 kcal de energia metabolizável por quilograma de dieta e sais minerais não fornecem energia metabolizável. A remoção de minerais desnecessários e substituição por grãos, portanto, aumenta a energia utilizável na dieta. Assim, a invenção é diferenciada com relação a uma ração contendo fitase comumente usada. Por exemplo, em um aspecto, um material biocompatível é usado, o qual é resistente à digestão

pelo trato gastrointestinal de um organismo.

[00505] Em muitos organismos incluindo, por exemplo, aves ou pássaros tais como, por exemplo, galinhas, perus, gansos, patos, papagaios, pavões, perdizes, faisões, codorna, pombos, emu, kiwi, mobelhas, calopsita, cacatua, canários, pinguins, flamingos e pombos, o trato digestivo inclui uma moela a qual armazena e usa objetos biocompatíveis duros (por exemplo, rochas e cascas de moluscos) para ajudar na digestão de sementes ou outra ração consumida por um pássaro. Um trato digestivo típico dessa família geral de organismos inclui o esôfago, o qual contém uma bolsa, denominada um papo, onde o alimento é armazenado durante um breve período de tempo. Do papo, o alimento se move para baixo para o estômago verdadeiro ou pró-ventrículo, onde ácido clorídrico e pepsina começam o processo de digestão. Em seguida, o alimento se move para a moela, a qual é de formato oval e com parede espessa com músculos poderosos. A função-chave da moela é triturar ou esmagar partículas de alimento - um processo o qual é auxiliado pelo fato de o pássaro engolir pequenas quantidades de cascalho ou areia fina. Da moela, o alimento se move para o duodeno. O intestino delgado dos pássaros é similar aos mamíferos. Existem duas bolsas cegas ou ceco, em torno de 10,16 cm a 15,24 cm (4-6 polegadas) de comprimento na junção dos intestino delgado e grosso. O intestino grosso é curto, consistindo em sua maioria do reto de cerca de 7,62 cm a 10,16 cm (3-4 polegadas) de comprimento. O reto esvazia na cloaca e as fezes são excretadas através da abertura.

[00506] Objetos biocompatíveis duros consumidos (ou de outro modo introduzidos) e presentes na moela proporcionam um vetor útil para distribuição de vários agentes enzimáticos, químicos, terapêuticos e antibióticos. Essas substâncias duras têm uma expectativa de vida de umas

poucas horas a uns poucos dias e são eliminadas após um período de tempo. Consequentemente, a invenção proporciona auxiliares dietéticos revestidos, impregnados (por exemplo, matriz e membranas impregnadas) modificados para a distribuição de agentes digestivos ou terapêuticos úteis a um organismo. Tais auxiliares dietéticos incluem objetos os quais são, tipicamente, ingeridos por um organismo para auxiliar na digestão dentro da moela (por exemplo, rochas ou areia). A invenção proporciona objetos biocompatíveis que têm, revestidos sobre os mesmos ou impregnados nos mesmos, agentes úteis como um auxiliar digestivo para um organismo ou para a distribuição de um agente terapêutico ou medicinal ou químico.

[00507] Em um aspecto, a invenção proporciona um auxiliar dietético tendo uma composição biocompatível criada para liberação de um agente que auxilia na digestão, em que a composição biocompatível é criada para consumo oral e liberação no trato digestivo (por exemplo, a moela) de um organismo. "Biocompatível" significa que a substância, quando de contato com um organismo hospedeiro (por exemplo, um pássaro), não-estimula uma resposta prejudicial suficiente para resultar na rejeição da substância ou tornar a substância inoperável. Tal inoperabilidade pode ocorrer, por exemplo, através de formação de uma estrutura fibrótica em torno da substância que limita a difusão de agentes impregnados ao organismo hospedeiro no mesmo ou uma substância a qual resulta em um aumento na mortalidade ou morbidade no organismo em virtude de toxicidade ou infecção. Uma substância biocompatível pode ser não-biodegradável ou biodegradável. Em um aspecto, a composição biocompatível é resistente à degradação ou à digestão pelo trato gastrointestinal. Em outro aspecto, a composição biocompatível tem a consistência de uma rocha ou pedra.

[00508] Um material não-biodegradável útil na invenção é um que

permite fixação ou impregnação de um agente dietético. Tais materiais não-biodegradáveis não-limitativos incluem, por exemplo, termoplásticos, tais como acrílico, modacrílico, poliamida, policarbonato, poliéster, polietileno, polipropileno, poliestireno, polissulfona, poliéter-sulfona e fluoreto de polivinilideno. Elastômeros também são materiais úteis e incluem, por exemplo, poliamida, poliéster, polietileno, polipropileno, poliestireno, poliuretano, álcool polivinílico e silicone (por exemplo, baseado em silicone ou contendo sílica). A invenção estabelece que a composição biocompatível pode conter uma pluralidade de tais materiais os quais podem ser, por exemplo, misturados ou colocados em camadas para formar misturas, copolímeros ou combinações dos mesmos.

[00509] Em um aspecto, um material "biodegradável" significa que a composição corroi ou degrada in vivo para formar espécies químicas menores. A degradação pode ocorrer, por exemplo, através de processos enzimáticos, químicos ou físicos. Materiais biodegradáveis adequados considerados para uso na invenção incluem, mas não-estão limitados a, (poli)lactídeos, (poli)glicolídeos, (poli) ácidos lácticos, (poli) ácidos glicólicos, polianidridos, poliortoésteres, poliéter ésteres, policaprolactona, poliesteramidas, policarbonato, policianoacrilato, poliuretanos, poliacrilato e similares. Tais materiais podem ser misturados ou colocados em camadas para formar misturas, copolímeros ou combinações dos mesmos.

[00510] Em um aspecto, uma série de diferentes substâncias biocompatíveis da invenção podem ser fornecidas ao animal e ingeridas sequencialmente ou de outro modo fornecidas ao mesmo organismo simultaneamente ou em várias combinações (por exemplo, um material antes do outro). Além disso, as substâncias biocompatíveis da invenção podem ser criadas para passagem lenta através do trato digestivo. Por exemplo,

substâncias grandes ou gordurosas tendem a se mover mais lentamente através do trato digestivo, conseqüentemente, um material biocompatível tendo um tamanho grande para prevenir passagem rápida no trato digestivo pode ser usado. Tais substâncias grandes podem ser uma combinação de substâncias não-biodegradáveis e biodegradáveis. Por exemplo, uma substância não-biodegradável pequena pode ser abrangida por uma substância biodegradável da invenção de modo que, durante um período de tempo, a porção biodegradável será degradada, permitindo que a porção não-biodegradável passe através do trato digestivo. Além disso, é reconhecido que qualquer número de flavorizantes pode ser fornecido a uma substância biocompatível da invenção para auxiliar no consumo.

[00511] Qualquer número de agentes, sozinhos ou em combinação com outros agentes, podem ser revestidos sobre as substâncias biocompatíveis da invenção, incluindo polipeptídeos (por exemplo, enzimas, anticorpos, citocinas ou pequenas moléculas terapêuticas) e antibióticos, por exemplo. Exemplos de agentes particulares úteis são listados nas Tabelas 1 e 2 abaixo. Considera-se também que células podem ser encapsuladas no material biocompatível da invenção e usadas para distribuir as enzimas ou produtos terapêuticos. Por exemplo, substâncias porosas podem ser criadas, as quais têm poros grandes o bastante para que as células cresçam em e através das mesmas e esses materiais porosos podem, então, ser captados pelo trato digestivo. Por exemplo, a substância biocompatível da invenção pode compreender uma pluralidade de ambientes de microflora (por exemplo, diferentes porosidades, pH, etc.) que proporcionam suporte para uma pluralidade de tipos de célula. As células podem ser geneticamente manipuladas para conferir um fármaco, enzima ou produto químico particular ao organismo. As células podem ser eucariotas ou procariotas.

Tabela 1

Classe de tratamento	Produto químico	Descrição
Antibióticos	Mastox, Amoxicilina e sua injeção combinada (Amoxicilina e Cloxacilina)	Tratamento contra doenças bacterianas causadas por bactérias Gram + e Gram -
	Ampicilina e sua injeção Biolo combinada (Ampicilina e Cloxacilina)	Tratamento contra doenças bacterianas causadas por bactérias Gram + e Gram -
	Bolo Nefrea, Nitrofurazona + Ureia	Tratamento de infecções genitais
	Bolo Trizol, Trimethoprim + Sulfametoxazol	Tratamento de infecções do trato respiratório, infecções do trato gastrointestinal, infecções urino-genitais
	Bolo Metofur, Metronidazola e Furazolidona	Tratamento de doenças bacterianas e por protozoários
	Bolo Pectolin, ftalil-sulfatiazol, Pectina e caulim, suspensão	Tratamento de diarreia bacteriana e não específica, disenteria bacilar e sujeiras em bezerros
Anti-helmínticos	Pomada ectoparasiticida Germex (Gama hexacloreto de benzeno, hemissulfato de Proflavina e Cetrimida)	Ectoparasiticida e Anti-séptico
	Endoparasiticidas > Albendazol e sua combinação Alben (Albendazol), suspensão (Albendazol a 2,5%), Suspensão Plus (Albendazol a 5%), Bolo Forte (Albendazol a 1,5 Gm.), Comprimido (Albendazol a 600 Mg.), pó (Albendazol a 5%, 15%)	Prevenção e tratamento de infestações de nematóides, cestóides e fasciola
	Comprimido Alpraz (Albendazol e Praziquantel)	Prevenção e tratamento de infestações de nematóides e cestóides em caninos e felinos
	Bolo Clozan, Oxiclozanida e sua combinação (Oxiclozanida), suspensão	Prevenção e tratamento de infestações de fasciola
	Bolo Tetzan (Oxiclozanida e HCl de Tetramisol), suspensão	Prevenção e tratamento de infestações de nematóides e fasciola
	Bolo Fluzan (Oxiclozanida e HCl de Levamisol), suspensão	Prevenção e tratamento de infestações de nematóides e aumento de imunidade
	Injeção Nemasol, Levamisol Pó Wormnil	Prevenção e tratamento de infestações de nematóides e aumento de imunidade
	Comprimido de Fembendazol, Fenzol (Fembendazol a 150 Mg.), bolo (Fembendazol a 1,5 Gm.), pó (Fembendazol a 2,5% PESO/PESO)	Prevenção e tratamento de infestações de nematóides e cestóides
Tônicos	Injeção Heptogen, complexo de Vitamina B, aminoácidos e extrato de fígado	Tratamento de anorexia, hepatite, debilidade, emaciação por convulsões neurálgicas, e crescimento atrofiado
	Injeção Hilactin, levulinato de cálcio com Vit. B12 e Vit. D3	Prevenção e tratamento de hipocalcemia, terapia de suporte em condições de doença (especialmente hipotermia) e tratamento de estágios iniciais de rickets

Classe de tratamento	Produto químico	Descrição
Suplementos de ração para animal	Bolo Gynolactin, minerais essenciais, selênio e Vitamina E	Tratamento de anestro que causa infertilidade e cio repetido em animais leiteiros e cavalos
	Pó Hilactin, minerais essenciais, Vitamina E e iodo	Infertilidade, lactação inapropriada, imunidade diminuída, crescimento atrofiado e debilidade
	Pó Electra - C, eletrólitos essenciais com Vitamina C	Diarreia, desidratação, antes e após transporte, em temperaturas extremas (altas ou baixas) e outras condições de estresse
	Bolo Pyrenox Plus (Diclofenac Sódico + Paracetamol), injeção	Tratamento de mastite, pirexia, dor e inflamação pós-cirúrgica, prolapso do útero, fraqueza e artrite

Tabela 2. Formulações terapêuticas

Produto	Descrição
Acutrim® (fenilpropanolamina)	Comprimidos supressores de apetite uma vez ao dia.
The Baxter® Infusor	Para distribuição intravenosa controlada de anticoagulantes, antibióticos, agentes quimioterapêuticos e outros fármacos amplamente usados.
Catapres-TTS® (sistema terapêutico transdérmico de clonidina)	Sistema transgênico uma vez por semana para o tratamento de hipertensão.
Covera HS3 (cloridrato de verapamila)	Comprimidos com liberação prolongada com início controlado uma vez ao dia (COER-24) para o tratamento de hipertensão e angina pectoris.
DynaCirc CR® (isradipina)	Comprimidos com liberação prolongada uma vez ao dia para o tratamento de hipertensão.
Efidac 24® (maleato de clorfeniramina)	Comprimidos com liberação prolongada uma vez ao dia para o alívio de sintomas de alergia.
Estraderm® (sistema transdérmico de estradiol)	Sistema transdérmico duas vezes por semana para o tratamento de determinados sintomas de pós-menopausa e prevenção de osteoporose.
Glucotrol XL® (glipizida)	Comprimidos com liberação prolongada uma vez por dia usados como um adjuvante na dieta para controlar a hipercalemia em pacientes com diabetes mellitus não dependente de insulina.
Bolo IVOMEK SR® (ivermectina)	Sistema de distribuição ruminal para controle ao longo da estação dos principais parasitas internos e externos em gado.
Minipress XL® (prazosina)	Comprimidos com liberação prolongada uma vez ao dia para o tratamento de hipertensão.
NicoDerm® CQ® (sistema transdérmico de nicotina)	Sistema transdérmico usado como um auxiliar uma vez ao dia para parar de fumar para aliviar os sintomas de abstinência de nicotina.
Procardia XL® (nifedipina)	Comprimidos com liberação prolongada uma vez ao dia para o tratamento de angina e hipertensão.
Sudafed® 24 Hour (pseudofedrina)	Descongestionante nasal uma vez ao dia para alívio de resfriados, sinusite, febre do feno e outras alergias respiratórias.
Transderm-Nitro® (sistema transdérmico de nitroglicerina)	Sistema transgênico uma vez ao dia para a prevenção de angina pectoris em virtude de doença da artéria coronária.
Transderm Scop® (sistema transdérmico de escopolamina)	Sistema transgênico para a prevenção de náusea e vômito associados à doença do movimento.
Volmax (albuterol)	Comprimidos com liberação prolongada para alívio de broncoespasmo em pacientes com doença obstrutiva reversível das vias aéreas.

Produto	Descrição
Actisite®	(Cloridrato de tetraciclina) Fibra periodontal usada como um adjunto para implante e planejamento de raiz para redução de profundidade da bolsa e hemorragia quando de exploração em pacientes com periodontite em adultos.
ALZET®	Bombas osmóticas para pesquisa em laboratório.
Amphotec® (complexo de anfotericina B - sulfato de colesiterila para injeção)	AMPHOTEC® é um tratamento fungicida para aspergilose invasiva em pacientes com lesão renal ou toxicidade inaceitável exclui o uso de anfotericina B em doses eficazes e em pacientes com aspergilose invasiva onde terapia anterior com anfotericina B tenha falhado.
BiCitra® (citrato de sódio e ácido cítrico)	Agente de alcalinização usado naquelas condições onde manutenção a longo prazo de urina alcalina é desejável.
Ditropan® (cloreto de oxibutinina)	Para o alívio de sintomas de instabilidade de bexiga associada à bexiga neurogênica ou neurogênica reflexa (isto é, urgência, frequência, vazamento urinário, incontinência de urgência, disúria).
Ditropan® XL (cloreto de oxibutinina)	É um comprimido com liberação controlada uma vez ao dia indicado para o tratamento da bexiga superativa com sintomas de incontinência urinária de urgência, urgência e frequência.
DOXIL® (injeção de lipossoma de HCl de doxorubicina)	
Duragesic® (sistema transdérmico de fentanila) CII	Sistema transdérmico de 72 horas para tratamento de dor crônica em pacientes que requerem analgesia contínua com opióide para dor que não pode ser tratada por meios mais fracos, tais como combinações de acetaminofen-opióide, analgésicos não-esteroidais ou dosagem PRN com opióides de curta duração.
Elmiron® (pentosan polissulfato sódico)	Indicado para o alívio de dor na bexiga o desconforto associado à cistite intersticial.
ENACT AirWatch®	Um sistema de monitoramento e tratamento de asma.
Ethylol® (amifostina)	Indicado para reduzir a toxicidade renal cumulativa associada à administração reforçada de cisplatina em pacientes com câncer ovariano avançado ou câncer de pulmão de células não pequenas. Indicado para reduzir a incidência de xerostomia moderada a grave em pacientes que sofrem tratamento de radiação pós-operatório para câncer de cabeça e pescoço, onde a radiação inclui uma porção substancial das glândulas parótidas.
Trocisco Mycelex® (clotrimazol)	Para o tratamento de candidíase orofaríngea. Também indicado profilaticamente para reduzir a incidência de candidíase orofaríngea em pacientes imunocomprometidos por condições que incluem quimioterapia, radioterapia ou terapia com esteróide utilizada no tratamento de leucemia, tumores sólidos ou transplante renal.
Neutra-Phos® (fosfato de potássio e sódio)	Um suplemento dietético/nutricional.
Solução Oral PolyCitra® -K e PolyCitra® Cristais -K (citrato de potássio e ácido cítrico)	Agente de alcalinização útil naquelas condições onde manutenção a longo prazo de uma urina alcalina é desejável, tal como em pacientes com cálculos por ácido úrico e cistina do trato urinário, especialmente quando a administração de sais de sódio é indesejável ou contraindicada.
PolyCitra® Xarope -K e LC (tricitratos)	Agente de alcalinização útil naquelas condições onde manutenção a longo prazo de uma urina alcalina é desejável, tal como em pacientes com cálculos por ácido úrico e cistina do trato urinário.
Progestasert® (progesterona)	Sistema contraceptivo intrauterino de progesterona.

Produto	Descrição
Testoderm® Testoderm® com Adesivo e Testoderm® TTS CIII	Sistema transdérmico de testosterona. Os produtos Testoderm® são indicados para terapia de reposição em homens para condições associadas a uma deficiência ou ausência de testosterona endógena: (1) hipogonadismo primário (congenito ou adquirido) ou (2) hipogonadismo hipogonadotrófico (congenito ou adquirido).
Viadur® (implante de acetato de leuprolida)	Implante uma vez por ano para o tratamento paliativo de câncer de próstata.

[00512] Determinados agentes podem ser projetados para se tornarem mais ativos sob determinadas condições (por exemplo, em determinados pH's, na presença de um agente de ativação, etc.). Além disso, pode ser vantajoso usar pró-enzimas nas composições da invenção. Por exemplo, pró-enzimas podem ser ativadas por uma protease (por exemplo, uma protease salivar que está presente no trato digestivo ou são artificialmente introduzidas no trato digestivo de um organismo). Considera-se que os agentes distribuídos pelas composições biocompatíveis da invenção são ativados através da adição de um agente de ativação o qual pode ser ingerido por ou de outro modo distribuído ao organismo. Outro mecanismo para o controle do agente no trato digestivo é um agente sensível ao ambiente que é ativado no compartimento digestivo apropriado. Por exemplo, um agente pode ser inativo em baixo pH, mas ativo em pH neutro. Consequentemente, o agente seria inativo no intestino, mas ativo no trato intestinal. Alternativamente, o agente pode se tornar ativo em resposta à presença de um fator específico a micro-organismo (por exemplo, micro-organismos presentes no intestino).

[00513] Em um aspecto, os benefícios potenciais da presente invenção incluem, por exemplo (1) redução em ou possível eliminação da necessidade de suplementos minerais (por exemplo, suplementos de fósforo inorgânico), enzimas ou fármacos terapêuticos para animal (incluindo peixe) a partir da ração ou grão diário, desse modo, aumentando a quantidade de

calorias e nutrientes presentes na ração e (2) saúde e crescimento aumentados de animais domésticos e não domésticos incluindo, por exemplo, aves, animais suínos, bovinos, equinos, caninos e felinos.

[00514] Um grande número de enzimas podem ser usadas nos métodos e composições da presente invenção, além das fitases da invenção. Essas enzimas incluem enzimas necessárias para digestão apropriada de alimentos consumidos ou para metabolismo, ativação ou derivação apropriados de produtos químicos, pró-fármacos ou outros agentes ou compostos distribuídos ao animal via o trato digestivo. Exemplos de enzimas que podem ser distribuídas ou incorporadas nas composições da invenção incluem, por exemplo, enzimas de intensificação de ração selecionadas do grupo consistindo em β -galactosidases, β -galactosidases, em particular lactases, fitases, β -glucanases, em particular endo- β -1,4-glucanases e endo- β -1,3(4)-glucanases, celulases, xilosidases, galactanases, em particular arabinogalactano endo-1,4- β -galactosidases e arabinogalactano endo-1,3- β -galactosidases, endoglucanases, em particular endo-1,2- β -glucanase, endo-1,3- α -glucanase e endo-1,3- β -glucanase, enzimas de degradação de pectina, em particular pectinases, pectinesterases, liases de pectina, poligalacturonases, arabinanases, rhamnogalacturonases, rhamnogalacturonana acetil esterases, rhamnogalacturonana- α -rhamnosidase, liases de pectato e α -galacturonisidases, mananases, β -manosidases, manana acetil esterases, xilana acetil esterases, proteases, xilanases, arabinoxilanases e enzimas lipolíticas, tais como lipases, fitases e cutinases. Fitases, além das fitases tendo uma sequência de aminoácido conforme apresentado em SEQ ID NO: 2, podem ser usadas nos métodos e composições da invenção.

[00515] Em um aspecto, a enzima usada nas composições (por

exemplo, um auxiliar dietético) da presente invenção é uma enzima fitase a qual é estável ao calor e é resistente ao calor e catalisa a hidrólise enzimática de fitato, isto é, a enzima é capaz de renaturar e reobter atividade após um período breve (isto é, 5 a 30 segundos) ou mais longo, por exemplo, minutos ou horas, de exposição a temperaturas acima de 50 °C.

[00516] Uma "ração" e um "alimento", respectivamente, significam qualquer dieta, refeição ou semelhante natural ou artificial ou componentes de tais refeições destinados a ou adequados para serem comidos, tomados, digeridos por um animal e um ser humano, respectivamente. "Auxiliar dietético", conforme usado aqui, denota, por exemplo, uma composição contendo agentes que proporcionam um agente terapêutico ou digestivo a um animal ou organismo. Um "auxiliar dietético", tipicamente, não é uma fonte de ingestão calórica para um organismo, em outras palavras, um auxiliar dietético, tipicamente, não é uma fonte de energia para o organismo, mas antes, é uma composição a qual é tomada além da "ração" ou "alimento" típico.

[00517] Em vários aspectos da invenção, são proporcionadas composições de ração que compreendem uma proteína fitase recombinante tendo pelo menos trinta aminoácidos contínuos de uma proteína tendo uma sequência de aminoácido de SEQ ID NO: 2; e um gênero alimentício contendo fitato. Conforme será conhecido por aqueles versados na técnica, tais composições podem ser preparadas através de uma série de formas incluindo, mas não-limitado a, na forma de pélete com ou sem aditivos poliméricos revestidos, na forma de granulado e através de secagem por pulverização. À guisa de exemplo não-limitativo, os ensinamentos na técnica dirigidos à preparação de reação incluem as Publicações Internacionais Nos. WO0070034 A1, WO0100042 A1, WO0104279 A1, WO0125411 A1,

WO0125412 A1 e EP 1073342A.

[00518] Um agente ou um enzima (por exemplo, uma fitase) pode exercer seu efeito in vitro ou in vivo, isto é, antes de ingestão ou no estômago ou moela do organismo, respectivamente. Também, uma ação combinada é possível.

[00519] Embora qualquer enzima possa ser incorporada em um auxiliar dietético, referência é feita aqui à fitase como uma exemplificação dos métodos e composições da invenção. Um auxiliar dietético da invenção inclui uma enzima (por exemplo, uma fitase). Geralmente, um auxiliar dietético contendo uma composição de fitase é líquida ou seca.

[00520] Composições líquidas não precisam conter qualquer coisa além da enzima (por exemplo, uma fitase), de preferência em uma forma altamente purificada. Usualmente, contudo, um estabilizante, tal como glicerol, sorbitol ou monopropileno glicol, é também adicionado. A composição líquida pode também compreender outros aditivos, tais com sais, açúcares, conservantes, agentes para ajuste de pH, proteínas, fitato (um substrato de fitase). Composições líquidas típicas são aquosas ou pastas fluidas baseadas em óleo. As composições líquidas podem ser adicionadas a uma composição biocompatível para liberação lenta. De preferência, a enzima é adicionada a uma composição auxiliar dietética que é um material biocompatível (por exemplo, biodegradável ou não-biodegradável) e inclui a adição de células recombinantes, por exemplo, em microcontas porosas.

[00521] Composições secas podem ser composições secas por pulverização, caso no qual a composição não precisa conter qualquer coisa além da enzima em uma forma seca. Usualmente, contudo, composições secas são os assim denominados granulados, os quais podem ser misturados com componentes de uma ração ou alimento ou, mais preferivelmente,

formar um componente de uma pré-mistura. O tamanho de partícula dos granulados de enzima é, de preferência, compatível com aquele dos outros componentes da mistura. Isso proporciona um meio seguro e conveniente de incorporação de enzimas em uma ração para animal. Os granulados da invenção podem ser biocompatíveis ou eles podem ser granulados biocompatíveis que são não-biodegradáveis.

[00522] Granulados de aglomeração da invenção revestidos por uma enzima podem ser preparados usando uma técnica de aglomeração em um misturador de cisalhamento elevado. Granulados de absorção são preparados tendo núcleos de um material-veículo a serem absorvidos revestidos pela enzima. Em um aspecto, o material veículo é um material biocompatível não-biodegradável que simula o papel de pedras ou areia na moela de um animal. Materiais enchedores típicos usados em técnicas de aglomeração incluem sais, tal como sulfato dissódico. Outros enchedores são caulim, talco, silicato de magnésio alumínio e fibras de celulose. Opcionalmente, aglutinantes, tais como dextrinas, também são incluídos nos granulados de aglomeração. Os materiais-veículo podem ser qualquer material biocompatível, incluindo materiais biodegradáveis e não-biodegradáveis (por exemplo, rochas, pedras, cerâmica, vários polímeros). Em um aspecto, os granulados são revestidos com uma mistura de revestimento. Tal mistura compreende agentes de revestimento, por exemplo, agentes de revestimento hidrofóbicos, tais como óleo de palma hidrogenado e sebo de carne e, se desejado, outros aditivos, tais como carbonato de cálcio ou caulim.

[00523] Em um aspecto, as composições auxiliares dietéticas (por exemplo, composições auxiliares dietéticas de fitase) podem conter outros substituintes, tais como agentes de coloração, compostos aromáticos, estabilizantes, vitaminas, minerais, outras enzimas para intensificação de

ração ou alimento, etc. Em um aspecto, um aditivo usado em uma composição da invenção compreende um ou mais compostos, tais como vitaminas, minerais ou enzimas para intensificação de ração e veículos e/ou excipientes adequados.

[00524] Em um aspecto, as composições auxiliares dietéticas da invenção compreendem, adicionalmente, uma quantidade eficaz de uma ou mais enzimas para intensificação de ração, em particular enzimas para intensificação de ração selecionadas do grupo consistindo em β -galactosidases, β -galactosidases, em particular lactases, outras fitases, β -glucanases, em particular endo- β -1,4-glucanases e endo- β -1,3(4)-glucanases, celulasas, xilosidases, galactanases, em particular arabinogalactano endo-1,4- β -galactosidases e arabinogalactano endo-1,3- β -galactosidases, endoglucanases, em particular endo-1,2- β -glucanase, endo-1,3- α -glucanase e endo-1,3- β -glucanase, enzimas de degradação de pectina, em particular pectinases, pectinesterases, liases de pectina, poligalacturonases, arabinanases, rhamnogalacturonases, rhamnogalacturonana acetil esterases, rhamnogalacturonana- α -rhamnosidase, liases de pectato e α -galacturonisidases, mananases, β -manosidases, manana acetil esterases, xilano acetil esterases, proteases, xilanases, arabinoxilanases e enzimas lipolíticas, tais como lípases, fitases e cutinases.

[00525] O auxiliar dietético para animal da invenção é suplementado ao animal monogástrico antes ou simultaneamente com a dieta. Em um aspecto, o auxiliar dietético da invenção é suplementado ao animal monogástrico simultaneamente com a dieta. Em outro aspecto, o auxiliar dietético é adicionado à dieta na forma de um granulado ou um líquido estabilizado.

[00526] Uma quantidade eficaz de uma enzima em um auxiliar dietético da invenção é de 10-20.000; de cerca de 10 a 15.000, de cerca de 10 a 10.000, de cerca de 100 a 5.000 ou de cerca de 100 a cerca de 2.000 FYT/kg de auxiliar dietético.

[00527] Exemplos não-limitativos de outros usos específicos da fitase da invenção são no processamento de soja e na fabricação de inositol ou derivados do mesmo.

[00528] A invenção também se refere a um método para redução dos níveis de fitato no estrume animal, em que o animal é alimentado com um auxiliar dietético contendo uma quantidade eficaz da fitase da invenção. Conforme estabelecido no início do presente pedido, um efeito importante do mesmo é reduzir a poluição por fosfato do ambiente.

[00529] Em outro aspecto, o auxiliar dietético é um veículo magnético. Por exemplo, um veículo magnético contendo uma enzima (por exemplo, uma fitase) distribuída em, sobre ou através de um veículo magnético (por exemplo, uma conta magnética porosa) pode ser distribuída sobre uma área com elevado teor de fitato e coletado por ímãs após um período de tempo. Tal distribuição e coleta de contas reduz a poluição adicional e permite a reutilização das contas. Além disso, o uso de tais contas magnéticas in vivo permite a localização do auxiliar dietético em um ponto do trato digestivo onde, por exemplo, atividade de fitase pode ser realizada. Por exemplo, um auxiliar dietético da invenção contendo enzimas digestivas (por exemplo, uma fitase) pode ser localizado na moela do animal através de justa-posicionamento de um ímã próximo da moela do animal após o animal consumir um auxiliar dietético de veículos magnéticos. O ímã pode ser removido após um período de tempo, permitindo que o auxiliar dietético passe através do trato digestivo. Além disso, os veículos

magnéticos são adequados para remoção do organismo após abate ou para auxiliar na coleta.

[00530] Quando o auxiliar dietético é uma partícula porosa, tais partículas são, tipicamente, impregnadas por uma substância com a qual se deseja liberar lentamente para permitir uma partícula com liberação lenta. Tais partículas com liberação lenta podem ser preparadas não apenas através de impregnação das partículas porosas com a substância que se deseja liberar, mas também primeiro através de dissolução da substância desejada na primeira fase de dispersão. Nesse caso, partículas com liberação lenta preparadas através do método no qual a substância a ser liberada é primeiro dissolvida na primeira fase de dispersão também estão dentro do escopo e espírito da invenção. As partículas ocas porosas podem, por exemplo, ser impregnadas com uma substância de liberação lenta, tal como um medicamento, agroquímico ou enzima. Em particular, quando partículas ocas porosas impregnadas por uma enzima são feitas de um polímero biodegradável, as partículas em si podem ser usadas como um agroquímico ou fertilizante e elas não têm efeito adverso sobre o ambiente. Em um aspecto, as partículas porosas são de natureza magnética.

[00531] As partículas ocas porosas podem ser usadas como um suporte de biorreator, em particular um suporte enzimático. Portanto, é vantajoso preparar o auxiliar dietético utilizando um método de liberação lenta, por exemplo, através de encapsulação da enzima de agente em uma microvesícula, tal como um lipossoma, do qual a dose é liberada durante o curso de vários dias, de preferência entre cerca de 3 a 20 dias. Alternativamente, o agente (por exemplo, uma enzima) pode ser formulado para liberação lenta, tal como incorporação em um polímero com liberação lenta do qual a dosagem de agente (por exemplo, enzima) é lentamente

liberada durante o curso de vários dias, por exemplo, de 2 a 30 dias e pode oscilar até a vida do animal.

[00532] Em um aspecto, os lipossomas da invenção são derivados de fosfolipídios ou outras substâncias lipídicas. Lipossomas são formados através de cristais líquidos hidratados mono- ou multilamelares que são dispersos em um meio aquoso. Qualquer lipídio não-tóxico, fisiologicamente aceitável e metabolizável capaz de formação de lipossomas pode ser usado. As composições da invenção na forma de lipossoma podem conter estabilizantes, conservantes, excipientes e similares, além do agente. Alguns lipídios exemplificativos são os fosfolipídios e as fosfatidil colinas (lecitinas), naturais e sintéticos. Métodos para formar lipossomas são conhecidos na técnica. Veja, por exemplo, Prescott, Ed., *Methods in Cell Biology*, Volume XIV, Academic Press, New York, N.Y. (1976), página 33 em diante.

[00533] Também dentro do escopo da invenção é o uso de uma fitase da invenção durante o preparo de preparados ou aditivos alimentícios ou ração, isto é, a fitase exerce sua atividade de fitase durante a fabricação apenas e não é ativa no produto alimentício ou ração final. Esse aspecto é relevante, por exemplo, na fabricação de massa e pão. Consequentemente, a fitase ou levedo recombinante expressando fitase pode ser impregnado em, sobre ou através de veículos magnéticos, distribuído na massa ou meio alimentício e recuperado através de ímãs.

[00534] O auxiliar dietético da invenção pode ser administrado sozinho aos animais em um veículo biocompatível (por exemplo, biodegradável ou não-biodegradável) ou em combinação com outros agentes aditivos de digestão. O auxiliar dietético da invenção pode ser prontamente administrado como um tratamento superficial ou através de mistura do

mesmo diretamente na ração do animal ou fornecido separadamente da reação, através de dosagem oral separada, através de injeção ou através de meios transdérmicos ou em combinação com outros compostos comestíveis relacionados ao crescimento, as proporções de cada um dos compostos na combinação sendo dependentes do organismo ou problema particular que está sendo considerado e do grau de resposta desejada. Deve ser entendido que a dosagem dietética específica administrada em qualquer determinado caso será ajustada de acordo com os compostos específicos que estão sendo administrados, o problema a ser tratado, a condição do indivíduo e os outros fatores relevantes que podem modificar a atividade do ingrediente eficaz ou a resposta do indivíduo, conforme é bem conhecido por aqueles versados na técnica. Em geral, uma única dose diária ou dosagens diárias divididas podem ser empregadas, conforme é bem conhecido na técnica.

[00535] Se administradas separadamente da ração do animal, as formas do auxiliar dietético podem ser preparadas através de combinação das mesmas com veículos comestíveis não-tóxicos farmacologicamente aceitáveis para fazer formulações com liberação imediata ou liberação lenta, conforme é bem conhecido na técnica. Tais veículos comestíveis podem ser sólidos ou líquidos tais como, por exemplo, amido de milho, lactose, sacarose, flocos de soja, óleo de amendoim, óleo de oliva, óleo de gergelim e propileno glicol. Se um veículo sólido é usado, a forma de dosagem dos compostos pode ser comprimidos, cápsulas, pós, trociscos ou pastilhas ou tratamentos de superfície, tais como formas microdispersíveis. Se um veículo líquido é usado, cápsulas de gelatina mole ou xarope ou suspensões líquidas, emulsões ou soluções podem ser a forma de dosagem. As formas de dosagem podem também conter adjuvantes, tais como agentes conservantes, estabilizantes, umidificantes ou de emulsificação, promotores

de solução, etc. Elas também podem conter outras substâncias terapeuticamente valiosas. Um processo para preparação de um veículo comestível granulado em alta temperatura para liberação de enzima quando ingerido é descrito no Pedido de Patente U.S. copendente No. de Série 09/910.579, depositado em 20 de Julho de 2001.

[00536] Em modalidades alternativas, vantagens significativas da invenção podem incluir 1) facilidade de fabricação do ingrediente ativo carregado em composições biocompatíveis; 2) versatilidade, uma vez que elas se referem à classe de polímeros e/ou ingredientes ativos os quais podem ser utilizados; 3) maiores rendimentos e eficiências de carregamento; e 4) o fornecimento de formulações com liberação sustentada que liberam agentes ativos intactos in vivo, assim, proporcionando uma liberação controlada de um agente ativo durante um período prolongado de tempo. Em uma modalidade, uma vantagem pode ser em virtude da distribuição local do agente no trato digestivo (por exemplo, a moela) do organismo. Em um aspecto, a frase "contido dentro" denota um método para formulação de um agente em uma composição útil para liberação controlada, durante um período prolongado de tempo do agente.

[00537] Em modalidades alternativas das composições com liberação sustentada ou liberação lenta da invenção, uma quantidade eficaz de um agente (por exemplo, uma enzima ou antibiótico) é utilizada. Em um aspecto, liberação sustentada ou liberação lenta se refere à liberação gradual de um agente de um material biocompatível, durante um período prolongado de tempo. A liberação sustentada pode ser contínua ou descontínua, linear ou não-linear e isso pode ser feito usando uma ou mais composições biodegradáveis ou não-biodegradáveis, carregamentos de fármaco, seleção de excipientes ou outras modificações. Contudo, deve ser reconhecido que

pode ser desejável proporcionar uma composição com liberação "rápida" que proporciona uma liberação rápida uma vez consumida pelo organismo. Deve também ser entendido que "liberação" não significa necessariamente que o agente é liberado do veículo biocompatível. Antes, em um aspecto, a liberação lenta abrange ativação lenta ou ativação contínua de um agente presente sobre a composição biocompatível. Por exemplo, uma fitase não precisa ser liberada da composição biocompatível para ser eficaz. Nesse aspecto, a fitase é imobilizada sobre a composição biocompatível.

[00538] A ração para animal pode ser qualquer farinha orgânica contendo proteína normalmente empregada para ir de encontro aos requisitos dietéticos de animais. Muitas de tais farinhas contendo proteína são, tipicamente, compostas primariamente de milho, farinha de soja ou uma mistura de farinha de milho/soja. Por exemplo, produtos típicos comercialmente disponíveis para alimentar aves incluem Egg Maker Complete, um produto de ração para aves da Land O'Lakes AG Services, bem como Country Game and Turkey Grower, um produto da Agwa, Inc. (veja o Manual da The Emu Farmer por Phillip Minnaar e Maria Minnaar). Ambos esses produtos comercialmente disponíveis são exemplos típicos de rações para animal com as quais o presente auxiliar dietético e/ou a enzima fitase pode ser incorporada para reduzir ou eliminar a quantidade de ingestão suplementar de fósforo, zinco, manganês e ferro requerida em tais composições.

[00539] A invenção proporciona novas formulações e suplementos e aditivos dietéticos e métodos para suplementação dietética de determinadas dietas, por exemplo, dieta de Atkins, dieta vegetariana, dieta macrobiótica, dieta veganismo ou dietas regionais, por exemplo, dietas de países em desenvolvimento. Alimentos associados a determinadas dietas, tais como

dietas de Atkins, vegetariana, macrobiótica, veganismo ou regional (por exemplo, dietas de países em desenvolvimento) enfatizam determinadas categorias de alimentos, tais como proteínas e gorduras, soja, etc. ou elas contam com safras nativas, por exemplo, cereais, arroz, feijões e semelhantes como contribuintes substanciais ou os únicos para a nutrição individual. Muitas dessas safras baseadas em cereal têm níveis elevados (3 a 10 vezes) de ácido fítico. Produtos alimentícios processados, tais como hidrolisato de proteína de soja e outros, parecem reter níveis elevados de ácido fítico e sua inclusão como uma fonte de proteína em barras nutritivas, pós e outros alimentos ou suplementos e ingredientes alimentícios aumenta a carga de ácido fítico experimentada pelos indivíduos que praticam essas dietas.

Prevenção e reversão de perda óssea

[00540] A invenção também proporciona novas formulações dietéticas e farmacêuticas a serem usadas como suplementos e aditivos e métodos para suplementação dietética, compreendendo fitases, por exemplo, incluindo uma fitase da invenção, para indivíduos predispostos à perda óssea, indivíduos com perda óssea e indivíduos com determinadas condições médicas, por exemplo, osteoporose, caquexia e tratamentos médicos, tais como quimioterapias, as quais comprometem a captação ou utilização apropriada de nutrientes essenciais. Os métodos e as composições da invenção podem ser usados sozinhos ou em combinação com outros suplementos ou regimes de tratamento, incluindo com medicações e similares. Por exemplo, as formulações, os suplementos dietéticos e os métodos para suplementação dietética podem ser administrados com outros suplementos dietéticos ou medicamentos para o tratamento ou prevenção de osteoporose, por exemplo, com vitamina D3 e/ou cálcio (os quais são

utilizados em prevenção de perda óssea). Em um aspecto, a invenção proporciona uma formulação compreendendo uma fitase, por exemplo, qualquer fitase ou uma fitase da invenção, para prevenção de perda óssea. Em um aspecto, a invenção proporciona uma formulação compreendendo uma fitase, por exemplo, qualquer fitase ou uma fitase da invenção, para reversão de perda óssea.

[00541] A formulação pode estar na forma de uma composição farmacêutica ou pode ser um aditivo a um produto farmacêutico, qualquer um dos quais pode estar nas formas líquida, sólido, pó, loção, pulverização ou aerossol. Composições farmacêuticas e formulações da invenção para administração oral podem ser formuladas usando veículos farmacêuticamente aceitáveis bem conhecidos na técnica em dosagens apropriadas e adequadas. Tais veículos permitem que os produtos farmacêuticos sejam formulados em formas de dosagem unitária, tais como pastilhas, pílulas, pó, drágeas, cápsulas, líquidos, comprimidos, géis, xaropes, pastas, suspensões, etc. adequadas para ingestão pelo paciente. Preparações farmacêuticas para uso oral podem ser formuladas como xaropes, pastas, suspensões, etc. adequados para ingestão pelo paciente. Preparações farmacêuticas para uso oral podem ser formuladas como um excipiente sólido, opcionalmente triturando uma mistura resultante e processando a mistura de grânulos, após adição de compostos extra, se desejado, para obter comprimidos ou núcleos de drágeas. Excipientes sólidos adequados são carboidrato ou proteína. Enchedores incluem, por exemplo, açúcares, incluindo lactose, sacarose, manitol ou sorbitol; amido de milho, trigo, arroz, batata ou outras plantas; celulose, tais como metil celulose, hidróxipropil metil celulose ou carbóxi metilcelulose de sódio; e gomas, incluindo goma arábica e tragacanto; e proteínas, por exemplo, gelatina e

colágeno. Agentes de desintegração ou solubilização podem ser adicionados, tais como polivinil pirrolidona reticulada, agar, ácido algínico ou um sal do mesmo, tal como alginato de sódio.

[00542] A invenção proporciona suspensões aquosas compreendendo uma fitase, por exemplo, uma fitase da invenção, em mistura com excipientes adequados para a fabricação de suspensões aquosas. Tais excipientes incluem um agente de suspensão, tal como carboximetil celulose de sódio, metil celulose, hidroxipropil metil celulose, alginato de sódio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto e goma acácia; e agentes de dispersão ou umedecimento, tal como um fosfatídeo que ocorre naturalmente (por exemplo, lecitina), um produto da condensação de um óxido de alquilenos com um ácido graxo (por exemplo, estearato de polioxietileno), um produto da condensação de óxido de etileno com um álcool alifático de cadeia longa (por exemplo, heptadeca etilenóxi cetanol), um produto da condensação de óxido de etileno com um éster parcial derivado de ácido graxo e um anidrido de hexitol (por exemplo, mono-oleato de polioxietileno sorbitol) ou um produto de condensação de óxido de etileno com éster parcial derivado de ácido graxo e anidrido hexitol (por exemplo, mono-oleato de polioxietileno sorbitano). A suspensão aquosa pode também conter um ou mais conservantes tais como p-hidroxibenzoato de etila ou de n-propila, um ou mais agentes de coloração, um ou mais agentes de flavorização e um ou mais agentes adoçantes, tais como sacarose, aspartame ou sacarina. As formulações podem ser ajustadas quanto à osmolaridade.

[00543] O regime de dosagem também leva em consideração parâmetros farmacocinéticos bem conhecidos na técnica, isto é, a taxa de absorção dos agentes ativos, biodisponibilidade, metabolismo, depuração e similares (veja, por exemplo, Hidalgo-Aragones (1996) J. Steroid Biochem.

Mol. Biol. 58: 611-617; Groning (1996) Pharmazie 51: 337-341; Fotherby (1996) Contraception 54: 59-69; Johnson (1995) J. Pharm. Sci. 84: 1144-1146; Rohatagi (1995) Pharmazie 50: 610-613; Brophy (1983) Eur. J. Clin. Pharmacol. 24: 103-108; a última edição de Remington, [The Science and Practice of Pharmacy](#), 20ª Ed. Lippincott Williams & Wilkins). O estado da técnica permite ao clínico determinar o regime de dosagem para cada paciente individual, agente ativo e doença ou condição tratada. Diretrizes fornecidas para composições similares usadas como produtos farmacêuticos podem ser usadas como orientação para determinar o regime de dosagem, isto é, esquema de dose e níveis de dosagem administrados na prática dos métodos da invenção (por exemplo, reversão de perda óssea ou prevenção de perda óssea) são apropriadas e corretas.

Suplementos para treinamento físico

[00544] A invenção também proporciona novos suplementos e aditivos dietéticos e métodos de uso dos mesmos compreendendo fitases, por exemplo, qualquer fitase ou uma fitase da invenção, para indivíduo que sofrem treinamento atlético ou outro físico intenso, por exemplo, treinamento de soldados. Treinamento atlético e hiperexercício podem consumir os nutrientes essenciais e requerer suplementação dietética. Essas dietas e condições têm, em comum, uma falta de micronutrientes essenciais, tais como metais (K, Ca, Fe, Zn, Mn, Se) e íons (PO₄) necessários para nutrição ótima. Dietas ricas em ácido fítico exacerbam esse problema e também podem levar a condições crônicas e agudas que resultam de dependência voluntária ou economicamente forçada de dietas ricas em alimentos com alto teor de ácido fítico.

[00545] Por exemplo, indivíduos que seguem várias dietas com baixo teor de carboidrato ("baixo carb") são, frequentemente, afetados com

câimbras musculares, por exemplo, nos músculos da perna. O conselho típico para isso é adicionar potássio, cálcio e outros nutrientes extras à sua dieta. A presente invenção proporciona composições para suplementação dietética, auxiliares dietéticos e métodos para suplementação da dieta para intensificar a nutrição de outro modo comprometida via a mobilização de macro e micronutrientes usando suplementação com fitase à dieta (incluindo uso de qualquer fitase ou uma fitase da invenção).

[00546] Em um aspecto da invenção, o uso de uma fitase (por exemplo, uso de qualquer fitase ou uma fitase da invenção) é otimizado para demonstrar os perfis termolábeis ou de estabilidade ao pH que a tornarão adequada para adição diretamente ao processamento de alimento e suplemento e/ou demonstrar estabilidade e atividade intensificadas no trato gastrointestinal de um ser humano ou animal.

[00547] A invenção também proporciona novos suplementos e aditivos dietéticos e métodos de uso dos mesmos compreendendo fitases, por exemplo, qualquer fitase ou uma fitase da invenção para indivíduos que estão sofrendo suplementação mineral. Suplementação mineral para pessoas com alimentação com alto teor de ácido fítico pode, na verdade, exacerbar problemas com a disponibilidade de nutrientes. Referências na literatura sugerem que complexos de ácido fítico, cálcio e zinco são muito mais insolúveis do que complexos de ácido fítico e cálcio. As pessoas frequentemente tomam suplementos multiminerais. A adição de fitase a um esquema aconselhado para combinar suplementos minerais na presença de alimentos com alto teor de ácido fítico poderia tornar esses suplementos muito mais eficazes.

[00548] Em aspectos alternativos, as composições e os métodos da invenção (compreendendo qualquer fitase ou uma fitase da invenção) são

usados como suplementos ou aditivos para:

- programas de perda de peso para limitar a ingestão de grupos de alimentos em particular, dietas vegetarianas, macrobióticas ou veganismo, os quais limitam ou excluem a ingestão de carnes, vegetais escuros, pães, etc. e outras dietas as quais focalizam a ingestão de nozes,
- suplementos específicos para indivíduos sob dietas com baixo teor de carbono ricas em alimentos com alto teor de ácido fítico para facilitar os sintomas fisiológicos de captação reduzida de minerais,
- regimes de treinamento atlético os quais buscam intensificar o desempenho através de ingestão dietética, incluindo regimes de treinamento militar,
- dietas de hospital configuradas para necessidades específicas de pacientes com ingestão comprometida ou restrita a grupos de alimentos,
- dietas com legumes ou cereais pobres em micronutrientes nos países em desenvolvimento,
- programas de merendas escolares.

[00549] A invenção também proporciona kits compreendendo composições da invenção (compreendendo qualquer fitase ou uma fitase da invenção) e instruções para incorporação da composição ou método da invenção nessas dietas. Os kits podem compreender qualquer embalagem, rótulo, bulas e similares.

[00550] Em um aspecto, a invenção proporciona uma fitase natural ou uma fitase otimizada da invenção formulada para ou otimizada para (por exemplo, sequência otimizada para) produção, processamento ou passagem através do sistema de um ser humano ou animal, por exemplo, o trato digestivo. A enzima fitase pode ser otimizada usando formulações alternativas.

[00551] Alternativamente, uma enzima fitase da invenção ou qualquer fitase pode ser otimizada através de manipulação de sua sequência, por exemplo, usando evolução dirigida, PCR propensa a erro, embaralhamento, mutagênese oligonucleotídeo-dirigida, PCR de montagem, mutagênese por PCR sexual, mutagênese in vivo, mutagênese em cassete, mutagênese de remontagem recursiva, mutagênese de remontagem exponencial, mutagênese sítio-dirigida, remontagem de ligação, GSSM® e qualquer combinação dos mesmos, para reter a atividade durante processamento, ingestão no intestino humano.

[00552] As composições (por exemplo, formulações dietéticas compreendendo qualquer enzima fitase ou uma enzima fitase da invenção) podem ser distribuídas através de uma série de formas para proporcionar eficácia dietética. Por exemplo, a invenção proporciona composições (por exemplo, formulações dietéticas ou aditivos compreendendo qualquer enzima fitase ou uma enzima fitase da invenção) e métodos compreendendo uso de:

- em suplementos alimentícios embalados, tais como comprimidos de mascar ou barras nutricionais,
- como um produto liofilizado disponível para hidratação antes de ingestão,
- coembalado com produtos dietéticos, por exemplo, produto de soja processado ou vendido como uma formulação com hidrolisato de proteína de soja e outras frações de processamento de alimentos integrais que são vendidos como ingredientes na indústria de alimentos processados,
- em produtos assados comerciais,
- pulverizados sobre cereais para café da manhã,
- formulações administradas por pulverização (por exemplo,

spray nasal),

- como um produto transgênico expresso em safras nativas, isto é, cereais e legumes (por exemplo, como um produto transgênico de um micro-organismo, tal como uma bactéria),
- como um organismo transgênico, por exemplo, um micro-organismo; por exemplo, um ser humano ou animal é alimentado com uma bactéria ou outro micro-organismo capaz de fazer (e, em uma modalidade alternativa, secretar) uma fitase recombinante, tal como uma fitase da invenção, após ingestão ou implante, por exemplo, no intestino do ser humano ou animal.

[00553] Produtos contendo fitase e métodos da invenção podem ser produzidos como um nutriente intensificado, nutriente compatível ou de outro modo destacados pela capacidade de intensificar o desempenho de nutriente e aliviar vários sintomas associados à deficiência de nutrientes.

[00554] Produtos contendo fitase e métodos da invenção são usados para aliviar os efeitos antinutritivos do fitato, o qual quelará minerais dietéticos importantes, tais como zinco, cobre, ferro, magnésio, estanho e cálcio. Consequentemente, os produtos contendo fitase e métodos da invenção são usados como suplementos dietéticos para prevenir a precipitação de enzimas de ligação a metal e proteínas em alimentos ingeridos. Em um aspecto, os produtos contendo fitase e métodos da invenção são usados para aliviar os efeitos antinutritivos de fitato em dietas de seres humanos, em particular aquelas ricas em legumes e cereais, para aumentar a biodisponibilidade de mineral. Em um aspecto, uma fitase em um suplemento dietético da invenção catalisa a remoção hidrolítica parcial ou completa de ortofosfato de um fitato, onde hidrólise completa de fitato resulta na produção de 1 molécula de inositol e 6 moléculas de fosfato

inorgânico.

[00555] Os produtos contendo fitase e métodos da invenção são aplicáveis à dieta de seres humanos e numerosos animais, incluindo aves e peixes. Por exemplo, os produtos suplementos dietéticos contendo fitase e métodos de suplementação dietética da invenção podem ser praticados com espécies comercialmente significativas, por exemplo, porcos, gado, ovelha, cabras, roedores de laboratório (ratos, camundongos, hamsters e gerbil), animais de pêlo, tais como marta e raposa e animais de zôo, tais como macacos e micos, bem como mamíferos domésticos, tais como cães e gatos. Espécies de ave comercialmente significativas típicas incluem galinhas, perus, patos, ganso, faisões, emu, avestruz, mobilhas, kiwi, pombos, papagaios, calopsita, cacatua, canários, pinguins, flamingos e codornas. Peixes comercialmente produzidos, tal como truta, também se beneficiarão dos auxiliares dietéticos divulgados aqui. Outros peixes que podem se beneficiar incluem, por exemplo, peixes (especialmente em um ambiente de aquário ou aquicultura, por exemplo, peixes tropicais), peixe-dourado e outras carpas ornamentais, bagre, truta, salmão, tubarão, raia, linguado, solha, tilápia, peixe-arroz, guppy, molly, platy, espadarte, peixe "paulistinha" e moreia.

[00556] Os produtos contendo fitase e métodos da invenção também são usados em vários ágar, géis, meios e soluções usados em cultura de tecidos e/ou células. Hidrolisatos de soja inconsistentes podem ser um problema encontrado quando de uso de cultura de tecidos e/ou células. Em um aspecto, os produtos contendo fitase e métodos da invenção são usados como aditivos para meios de cultura de célula ou como tratamentos, por exemplo, para aumentar o rendimento e consistência de desempenho da cultura de células. Em um aspecto, a invenção proporciona um hidrolisato

para cultura de células compreendendo fitases, por exemplo, fitases da invenção.

[00557] Em um aspecto, para proporcionar um produto consistente, a invenção proporciona métodos para a fabricação de hidrolisatos, suplementos ou outros aditivos para cultura de células compreendendo fitases usando biomarcadores de fitase. Por exemplo, o método compreenderá "classificação" ou "marcação" de várias moléculas de fitase em bateladas de hidrolisato, suplemento ou outro aditivo e, então, mistura das bateladas no hidrolisato, suplemento ou outro aditivo para obter um padrão de biomarcador consistente. Em um aspecto, o desempenho de cultura com cada batelada é medido em (um) minirreator(es) e o desempenho de cada biomarcador e batelada é correlacionado. Em um aspecto, uma mistura é feita para gerar um produto com um desempenho maior que é consistente ou melhor do que a média. Em um aspecto, tiorredoxina (TRX) é adicionada para aumentar a biodisponibilidade de muitas proteínas eliminando a estrutura secundária causada pelas ligações de dissulfeto. Em um aspecto, proteases também são adicionadas aos hidrolisatos, suplementos ou aditivos da invenção. As proteases podem ser "classificadas" ou a qualidade controlada com outros biomarcadores (como uma fitase, conforme discutido acima) para dirigir o processo de mistura.

[00558] Em um aspecto, a invenção proporciona métodos para a adição de fitases a grãos e proporcionar um produto consistente usando um processo de "classificação" ou controle de qualidade de biomarcador análogo àquele descrito acima para os hidrolisatos, suplementos ou aditivos da invenção.

Dietas enzima-intensificadas para eficiência de combate e moral intensificadas

[00559] Em um aspecto, a invenção proporciona novos suplementos dietéticos e aditivos e métodos para suplementação da dieta compreendendo fitases, por exemplo, qualquer fitase ou uma fitase da invenção, para dietas enzima-intensificadas para eficiência de combate e moral. Em um aspecto, essas composições de suplemento dietético da invenção funcionam, in situ, para intensificar a energia, vigor e moral em um formato estável, facilmente utilizável e desejável, ao mesmo tempo em que limita o desperdício de alimento.

[00560] Em um aspecto, as composições de suplemento dietético e métodos da invenção se dirigem ao desafio operacional militar compreendendo distribuição eficiente de nutrientes e a saúde, moral e eficácia operacional associadas de soldados. A invenção proporciona enzimas otimizadas para funcionar eficientemente no intestino humano. Essas enzimas podem intensificar a extração de nutrientes e a geração de energia, bem como prolongar a manutenção de suficiência nutricional e saciedade individual.

[00561] Além de fitase, outras enzimas, por exemplo, amilases, xilanases, proteases, lipases, são usadas para a prática das composições de suplemento dietético e métodos da invenção. Em um aspecto, a invenção proporciona formulações, suplementos alimentícios, alimentos, unidades de refeições prontas para comer autocontidas (MREs), bebidas, agentes de hidratação e semelhantes compreendendo fitase, por exemplo, uma fitase da invenção e outra enzima, por exemplo, amilases, xilanases, proteases, lipases ou uma combinação das mesmas. Quando ingeridas com alimento, foi mostrado que essas enzimas intensificam a liberação de nutrientes críticos, por exemplo, fósforo, metais e íons essenciais, aminoácidos e açúcares. Além disso, a coingestão dessas enzimas aumenta a mecânica e absorção

gastrointestinal através de despolimerização de celulose, hemicelulose e amido derivados de planta. O presente documento propõe o desenvolvimento dessas enzimas como suplementos para dietas militares para proporcionar utilização intensificada de nutrientes para combate.

[00562] Em um aspecto, o suplemento alimentício da invenção causa a liberação de fosfato essencial de fitato derivado de planta normalmente antinutritivo, para aumentar o rendimento de energia do alimento e depósito de CaPO_4 no osso. Em um aspecto, fitases e outras enzimas como suplemento nutricional potencial podem suportar o pH do intestino e atividades de protease endógena.

[00563] Em um aspecto, a invenção proporciona suplementos enzimáticos para rações, bebidas, alimentos, MREs, agentes de hidratação e semelhantes para melhorar significativamente o valor nutricional, digestibilidade e teor de energia de farinhas para militares (ou qualquer farinha, incluindo farinha para o consumidor em geral e produtos de suplementação dietética) servidas a combatentes em treinamento, batalha ou qualquer situação estressante. O suplemento pode ser formulado para facilidade de uso e transporte pessoal (em ou com MREs, agentes de hidratação, etc.). Em um aspecto, o suplemento enzimático não comprometerá a aparência, o sabor e/ou a consistência do alimento. Em um aspecto, o produto melhora a saúde e aumenta o vigor de combatentes.

[00564] Em aspectos alternativos, o suplemento enzimático é distribuído através de uma série de formas para proporcionar eficácia dietética; por exemplo, a invenção proporciona fitases, incluindo fitases da invenção e, em alguns aspectos, enzimas adicionais em:

- suplementos de bebida ou alimentícios embalados, tais como MREs, rações, kits de sobrevivência, agentes de hidratação, comprimidos

mastigáveis ou barras nutricionais;

- como um produto liofilizado (por exemplo, um pó) disponível para hidratação antes de ingestão;
- coembalados com produtos dietéticos, alimentos, bebidas, por exemplo, produto de soja processado ou uma formulação com hidrolisato de proteína de soja e outras frações de processamento de alimentos integrais que são vendidos como ingredientes pela indústria de alimentos processados;
- em produtos assados;
- pulverizados sobre cereais;
- formulações tais como comprimidos, gélulas, cápsulas, sprays e similares.

[00565] Em um aspecto, as composições e os métodos da invenção proporcionam suplementação nutricional que libera rapidamente calorias e macro-e micronutrientes de farinhas ingeridas. Em um aspecto, as composições e os métodos da invenção proporcionam energia e resistência corporal aos indivíduos em situações estressantes, por exemplo, envolvendo hiperexercício e períodos descontínuos de privação. Em um aspecto, as composições e os métodos da invenção proporcionam enzimas otimizadas e formuladas para funcionar eficazmente no intestino humano, ao mesmo tempo em que mantêm a estabilidade, vida útil e transportabilidade para um ambiente desejado, por exemplo, um ambiente militar.

[00566] Em um aspecto, as composições e os métodos da invenção proporcionam formulações para características de sabor, capacidade de dissolução, capacidade de mastigação e eficiência de transporte pessoal do produto. Em um aspecto, as composições e os métodos da invenção ainda compreendem outros componentes, tais com potássio, glicose, CaCl_2 . CaCl_2

na formulação pode se combinar com o fosfato liberado e, por sua vez, intensificar o depósito ósseo e ganho de peso. Em um aspecto, as composições e métodos da invenção ainda compreendem formulações de outras enzimas, tais como proteases, celulasas, hemicelulasas, para digestão de proteína, celulose e hemicelulose, respectivamente. Essas enzimas podem melhorar a disponibilidade de proteína e amido e, ainda, aumentar a absorção de ferro de muitos alimentos ricos em ferro.

[00567] Em um aspecto, as composições e os métodos da invenção ainda compreendem enzimas para hidrólise de alimentos derivados de material vegetal os quais são ricos em polímeros baseados em glicose e xilose, celulose, hemicelulose e amido, bem como no polímero de aminoácido, proteína. Em um aspecto, as composições e os métodos da invenção facilitam a hidrólise de materiais poliméricos em alimentos; isto é, facilitar a digestão completa de polímeros em monômeros, por exemplo, polissacarídeos em açúcares monoméricos ou proteínas em porções de aminoácido. Assim, nesse aspecto, as composições e métodos da invenção permitem que um alimento, uma bebida ou uma ração obtenham seu valor calórico e nutricional total. Em um aspecto, a suplementação com enzima compreende o uso de enzimas estáveis, por exemplo, hidrolases de vários tipos, celulasas, hemicelulasas, amilases, lipases, amidases, proteases e outras enzimas. Em um aspecto, as enzimas usadas nas composições e os métodos da invenção podem suportar as condições ambientais do intestino, isto é, estabilidade em baixo pH e na presença de proteases gástricas.

Usos industriais de fitases

[00568] Além daqueles descritos acima, a invenção proporciona novos usos industriais para fitases, incluindo o uso das novas fitases da invenção.

Redução de poluição por fosfato no ambiente

[00569] Em um aspecto, a invenção proporciona composições compreendendo fitases (incluindo as fitases da invenção) para adição à águas servidas ou pilhas de estrume para converter ácido fítico "ambiental". Em um aspecto, isso serve às finalidades de redução de poluição e aumento da disponibilidade de nutriente. A invenção também proporciona composições e métodos para adição de uma fitase ao solo, corpos naturais ou artificiais de água (por exemplo, lagos, reservatórios, poços, reservatórios naturais e similares), esgoto municipal, qualquer efluente de águas servidas e similares. Conforme descrito acima, a invenção proporciona composições e métodos para redução dos níveis de fitato em águas servidas ou esgoto, por exemplo, um estrume de animal, em que o animal é alimentado com um auxiliar dietético contendo uma quantidade eficaz de uma fitase, por exemplo, uma fitase da invenção. Uma aplicação exemplificativa das composições e os métodos da invenção é reduzir a poluição por fosfato no ambiente. Assim, as composições e métodos da invenção podem ser usados em qualquer aplicação que reduz a poluição através de degradação de ácidos fílicos.

Aplicações em fazenda e crescimento de plantas

[00570] Em um aspecto, a invenção proporciona composições compreendendo fitases (incluindo as fitases da invenção) e métodos para aplicações em fazenda ou outras aplicações de crescimento de planta, por exemplo, adição de fitases a fertilizantes ou aditivos alimentícios vegetais (por exemplo, MIRACLEGROW®) para plantas, por exemplo, plantas domésticas. No uso das composições e dos métodos da invenção para aplicações em fazenda, os usuários incluem fazendas orgânicas. As composições e os métodos da invenção podem ser usados para adição de

fitases a qualquer solo deficiente de fósforo ou que precisa de fósforo suplementar para uma safra ou aplicação em particular. Em virtude do fato de o fósforo liberado ajudar o crescimento da planta, as composições e os métodos da invenção podem ser usados para adição de fitases a qualquer coisa que tenha alga ou material vegetal.

Produtos de fabricação

[00571] A invenção proporciona uma variedade de produtos de fabricação compreendendo uma ou mais fitases da presente invenção. Por exemplo, em um aspecto, a invenção proporciona composições compreendendo fitases (incluindo as fitases da invenção) e métodos para aplicações cosméticas, por exemplo, xampus, loções ou sabonetes contendo produtos vegetais.

[00572] Em um aspecto, a invenção proporciona composições compreendendo fitases (incluindo as fitases da invenção) e métodos para imobilização da fitase. Em um aspecto, a fitase imobilizada atua como um mecanismo de liberação controlada. Por exemplo, em um aspecto, a invenção proporciona formulações com liberação controlada (liberação com o tempo) de fitases para aplicação ao solo, por exemplo, argila, à plantas domésticas, etc. Em um aspecto, as fitases são imobilizadas em contas, por exemplo, contas polisorb. Essas contas podem ser distribuídos ao solo, por exemplo, para plantas agrícolas ou domésticas. Em outro aspecto, formulações com liberação controlada (liberação com o tempo) de fitases da invenção são usadas em suplementos dietéticos e aditivos.

Biocombustíveis e conversão de biomassa

[00573] A invenção proporciona métodos para a fabricação de combustíveis, por exemplo, biocombustíveis, compreendendo o uso de uma ou mais fitases da presente invenção; incluindo fornecimento de

combustíveis, por exemplo, biocombustíveis compreendendo uma ou mais fitases da presente invenção. A invenção proporciona métodos para conversão de biomassa compreendendo o uso de uma ou mais fitases da presente invenção.

[00574] Em um aspecto, a invenção proporciona composições compreendendo fitases (incluindo as fitases da invenção) e métodos para uso da fitase em um processo de produção de álcool ou fermentação, por exemplo, produção de etanol. Por exemplo, as composições e os métodos da invenção podem ser usados para proporcionar alternativas ou adjuntos eficazes e sustentáveis ao uso de produtos baseados em petróleo, por exemplo, como uma mistura de bioetanol e gasolina.

[00575] A presente invenção proporciona organismos expressando enzimas da invenção para participação em ciclos químicos envolvendo conversão de biomassa natural. Além disso, a combinação de fitase (por exemplo, uma enzima da presente invenção) com uma ou mais enzimas de degradação de amido, tais como amilase ou glicoamilase, melhora a produção de etanol a partir de amido. A invenção proporciona métodos para a descoberta e implementação das enzimas mais eficazes para permitir esses novos processos industriais importantes de "conversão de biomassa" e energia alternativa.

Conversão de biomassa e produção de biocombustíveis limpos

[00576] A invenção proporciona polipeptídeos, incluindo enzimas (fitases da invenção) e anticorpos e métodos para o processamento de uma biomassa ou qualquer material lignocelulósico (por exemplo, qualquer composição compreendendo uma celulose, hemicelulose e lignina) a um combustível (por exemplo, um bioetanol, biopropanol, biobutanol, biopropanol, biometanol, biodiesel), além de rações, alimentos e produtos

químicos. Por exemplo, em um aspecto, uma enzima da invenção decompõe o ácido fítico indigerível (fitato) em uma biomassa (por exemplo, um material lignocelulósico, um grão ou uma semente no solo) para liberar fósforo digerível; assim, em uma modalidade, as fitases da presente invenção são usadas para tratar ou pré-tratar uma biomassa.

[00577] Assim, as composições e os métodos da invenção podem ser usados na produção e/ou processamento de biocombustíveis, por exemplo, para proporcionar alternativas e/ou adjuntos eficazes e sustentáveis ao uso de produtos baseados em petróleo; por exemplo, composições e métodos da invenção podem ser usados com uma mistura de enzimas para produzir um biocombustível - tal como biometanol, bioetanol, biopropanol, biobutanol, biodiesel e similares; os quais podem ser adicionados a um combustível diesel, uma gasolina, um querosene e similares. A invenção proporciona organismos expressando enzimas da invenção para participação em ciclos químicos envolvendo conversão de biomassa natural. Em um aspecto, as enzimas e os métodos para a conversão são usados em grupos de enzima para processamento eficiente de biomassa em conjunto com a despolimerização de polissacarídeos, polímeros celulósicos e/ou hemicelulósicos em porções de carbono metabolizáveis (por exemplo, fermentáveis). A invenção proporciona métodos para a descoberta e implementação das enzimas mais eficazes para permitir esses novos processos industriais importantes de "conversão de biomassa" e energia alternativa.

[00578] As composições e os métodos da invenção podem ser usados para proporcionar alternativas ou adjuntos eficazes e sustentáveis ao uso de produtos baseados em petróleo, por exemplo, como uma mistura de bioetanol, biopropanol, biobutanol, biopropanol, biometanol e/ou biodiesel e

gasolina. A invenção proporciona métodos para a descoberta e implementação das enzimas mais eficazes para permitir esses novos processos industriais importantes de "conversão de biomassa" e energia alternativa.

[00579] A invenção proporciona métodos, enzimas e misturas de enzimas ou "coquetéis" da invenção para processamento de um material, por exemplo, um material de biomassa, por exemplo, composições compreendendo um celo-oligossacarídeo, um oligômero de arabinoxilano, uma lignina, uma lignocelulose, um xilano, um glicano, uma celulose e/ou um açúcar fermentável; por exemplo, incluindo métodos compreendendo contato da composição com um polipeptídeo da invenção ou um polipeptídeo codificado por um ácido nucleico da invenção em que, opcionalmente, o material é derivado de uma safra agrícola (por exemplo, trigo, cevada, batatas, gramínea, madeira de álamo), é um subproduto da produção de um alimento ou ração, é um produto residual lignocelulósico ou é um resíduo de planta ou um papel residual ou produto residual de papel e, opcionalmente, o resíduo de planta compreende caules, folhas, cascas, milho ou sabugos de milho, ensilagem de milho, fibra de milho, feno, palha (por exemplo, palha de arroz ou palha de trigo), bagaço de cana-de-açúcar, polpa de beterraba sacarínica, polpa de cítricos e cascas de cítricos, madeiras, aparas de madeira, lascas de madeira, polpa de madeira, resíduo de polpa, resíduo de madeira, restos de madeira e serragem, resíduos e restos de construção e/ou demolição (por exemplo, madeira, lascas de madeira e serragem) e opcionalmente o resíduo de papel compreende papel de fotocópia descartado ou usado, papel de impressora de computador, papel de caderno, papel de agenda, papel de máquina de escrever, jornais, revistas, papelão e materiais de embalagem baseados em papel e materiais de papel

reciclado. Além disso, resíduos urbanos, por exemplo, a fração de papel de resíduos sólidos municipais, resíduos de madeira municipais e resíduos verdes municipais, junto com outros materiais contendo açúcar, amido e/ou celulose podem ser usados. Em modalidades alternativas, o processamento do material, por exemplo, do material de biomassa, gera um bioálcool, por exemplo, um biodiesel, bioetanol, biometanol, biobutanol ou biopropanol.

[00580] Alternativamente, o polipeptídeo da invenção pode ser expresso no material de planta de biomassa ou estoque de alimentação em si.

[00581] Os métodos da invenção também incluem tomar o material lignocelulósico convertido (processado pelas enzimas da invenção) e transformá-lo em um combustível (por exemplo, um bioálcool, por exemplo, um bioetanol, biometanol, biobutanol ou biopropanol ou biodiesel) através de fermentação e/ou síntese química. Em um aspecto, os açúcares produzidos são fermentados e/ou os produtos não-fermentados são gaseificados.

[00582] Os métodos da invenção também incluem conversão de algas, óleos vegetais virgens, óleos vegetais residuais, gorduras e sebos de animais (por exemplo, sebo, banha e gordura amarela) ou águas servidas usando as enzimas da invenção e transformando-os em um combustível (por exemplo, um bioálcool, por exemplo, um bioetanol, biometanol, biobutanol ou biopropanol ou biodiesel) através de fermentação e/ou através de síntese química ou conversão.

[00583] As enzimas da invenção (incluindo, por exemplo, organismos, tais como micro-organismos, por exemplo, fungos, levedos ou bactérias, que produzem e, em alguns aspectos, secretam as enzimas recombinantes da invenção) podem ser usadas em ou incluídas/integradas em qualquer estágio de qualquer processo de conversão de biomassa, por

exemplo, em qualquer uma etapa, várias etapas ou incluídas em todas as etapas ou todos os métodos a seguir de processos de conversão de biomassa ou todas essas alternativas a biocombustível:

Combustão direta: a queima de material através de calor direto é a tecnologia de biomassa mais simples; pode ser muito econômica se uma fonte de biomassa está próxima.

[00584] Pirólise: é a degradação térmica de biomassa através de calor na ausência de oxigênio. Em um aspecto, a biomassa é aquecida para uma temperatura entre cerca de 800 e 1400 graus Fahrenheit, mas nenhum oxigênio é introduzido para sustentar a combustão, resultando na criação de gás, óleo combustível de carvão.

[00585] Gaseificação: a biomassa pode ser usada para produzir metano através de aquecimento ou digestão anaeróbica. Syngas, uma mistura de monóxido de carbono e hidrogênio, pode ser derivado da biomassa.

[00586] Gás de Aterro: é gerado pelo declínio (digestão anaeróbica) de lixo enterrado em aterros. Quando o resíduo orgânico se decompõe, ele gera gás consistindo em aproximadamente 50% de metano, o principal componente do gás natural.

[00587] Digestão Anaeróbica: converte matéria orgânica em uma mistura de metano, o principal componente do gás natural e dióxido de carbono. Em um aspecto, a biomassa, tal como águas servidas (esgoto), estrume ou resíduo de processamento de alimento, é misturada com água e alimentada a um tanque de digestão sem ar.

Fermentação

- Fermentação de álcool: álcool combustível é produzido através de conversão de massa celulósica e/ou amido em açúcar, fermentação do anticorpo em álcool, então, separação da mistura aquosa de

álcool através de destilação. Estoques de alimentação, tais como safras especializadas (por exemplo, milho, trigo, cevada, batatas, gramínea, Miscanthus, madeira de álamo), resíduos e restos agrícolas (por exemplo, palha de arroz, ensilagem de milho, bagaço de cana-de-açúcar, cascas de arroz, fibra de milho, polpa de beterraba sacarínica, polpa de cítricos e cascas de cítricos), resíduos de floresta (por exemplo, aparas de madeira dura e madeira macia, resíduos de madeira dura e madeira macia de operações de corte de madeira, lascas de madeira e serragem), resíduos urbanos (por exemplo, fração de papel de resíduos sólidos municipais, resíduos de madeira municipais, resíduos verdes municipais), resíduos de madeira (por exemplo, resíduos de moagem de serra, resíduos de moagem de polpa, resíduos de construção, resíduos de demolição, aparas de madeira e serragem) e papel residual ou outros materiais contendo açúcar, amido e/ou celulose podem ser convertidos em açúcares e, então, a um álcool através de fermentação com levedo. Alternativamente, materiais contendo açúcares podem ser convertidos diretamente em álcool através de fermentação.

Transesterificação: uma reação exemplificativa para conversão de óleo em biodiesel é denominada transesterificação. O processo de transesterificação reage um álcool (tal como metanol) com os óleos de triglicerídeo contidos em óleos vegetais, gorduras animais ou gorduras recicladas, formando alquil ésteres de ácido graxo (biodiesel) e glicerina. A reação requer calor e um forte catalisador de base, tal como hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio.

[00588] Biodiesel: biodiesel é uma mistura de alquil ésteres de ácido graxo feitos de óleos vegetais, gorduras animais ou gorduras recicladas. O biodiesel pode ser usado como um combustível para veículos em sua forma pura, mas é usualmente usado como um aditivo ao diesel de petróleo para

reduzir os níveis de partículas, monóxido de carbono, hidrocarbonetos e produtos tóxicos no ar de veículos supridos por diesel.

[00589] Hidrólise: inclui hidrólise de um composto, por exemplo, uma biomassa, tal como um material lignocelulósico, catalisada usando uma enzima da presente invenção.

[00590] Co-geração: é a produção simultânea de mais de uma forma de energia usando um único combustível e instalação. Em um aspecto, a co-geração de biomassa tem mais crescimento potencial do que a geração de biomassa sozinha porque a co-geração produz calor e eletricidade.

[00591] Em um aspecto, os polipeptídeos da invenção podem ser usados em conjunto com outras enzimas, por exemplo, hidrolases ou enzimas tendo atividade celulolítica, por exemplo, uma glucanase, endoglucanase, manase e/ou outra enzima, para a geração de um combustível, tal como um bioálcool, por exemplo, um bioetanol, biometanol, biobutanol ou biopropanol ou biodiesel, a partir de qualquer material orgânico, por exemplo, uma biomassa, tal como composições derivadas de plantas e animais, incluindo qualquer safra agrícola ou outro estoque de alimentação renovável, um resíduo agrícola ou um resíduo animal, os componentes orgânicos de resíduos municipais e industriais ou resíduos ou restos de construção ou demolição ou micro-organismos, tais como algas ou levedo.

[00592] Em um aspecto, os polipeptídeos da invenção são usados em processos para conversão de biomassa lignocelulósica a um combustível (por exemplo, um bioálcool, por exemplo, um bioetanol, biometanol, biobutanol ou biopropanol ou biodiesel) ou de outro modo são usados em processos para hidrólise ou digestão de biomateriais, de modo que eles podem ser usados como um combustível (por exemplo, um bioálcool, por

exemplo, um bioetanol, biometanol, biobutanol ou biopropanol ou biodiesel) ou para tornar mais fácil para que a biomassa seja processada em um combustível.

[00593] Em um aspecto alternativo, os polipeptídeos da invenção, incluindo a mistura de enzimas ou "coquetéis" da invenção, são usados em processos para a transesterificação de reação de um álcool (tal como etanol, propanol, butanol, propanol, metanol) com um óleo de triglicerídeo contido em um óleo vegetal, gordura animal ou gorduras recicladas, formando alquil ésteres de ácido graxo (biodiesel) e glicerina. Em um aspecto, biodiesel é feito de óleo de soja ou óleos de cozinha reciclados. Gorduras animais, outros óleos vegetais e outros óleos reciclados também podem ser usados para produzir biodiesel, dependendo de seus custos e disponibilidade. Em outro aspecto, misturas de todos os tipos de gorduras e óleos são usadas para produzir um combustível biodiesel da invenção.

[00594] As enzimas da invenção, incluindo as misturas de enzimas ou "coquetéis" da invenção também podem ser usados no refino de glicerina. O subproduto da glicerina contém catalisador não reagido e sabões que são neutralizados com um ácido. Água e álcool são removidos para produzir 50% a 80% de glicerina bruta. Os contaminantes restantes incluem gorduras e óleos não reagidos, os quais podem ser processados usando os polipeptídeos da invenção. Em grandes fábricas de biodiesel da invenção, a glicerina pode ser ainda purificada, por exemplo, para 99% ou uma pureza maior, para as indústrias farmacêutica e cosmética.

[00595] Combustíveis (incluindo bioálcoois, tais como bioetanol, biometanol, biobutanol ou biopropanol ou biodiesel) feitos usando os polipeptídeos da invenção, incluindo a mistura de enzimas ou "coquetéis" da invenção, podem ser usados com oxigenatos de combustível para melhorar

as características de combustão. A adição de oxigênio resulta em combustão mais completa, o que reduz as emissões de monóxido de carbono. Esse é outro benefício ambiental de substituição de combustíveis de petróleo por biocombustíveis (por exemplo, um combustível da invenção). Um biocombustível feito usando as composições e/ou métodos da presente invenção podem ser misturados com gasolina para formar uma mistura E10 (cerca de 5% a 10% de etanol e cerca de 90% a 95% de gasolina), mas pode ser usado em concentrações maiores, tal como E85 ou em sua forma pura. Um biocombustível feito usando as composições e/ou métodos da presente invenção pode ser misturado com diesel de petróleo para formar uma mistura B20 (20% de biodiesel e 80% de diesel de petróleo), embora outros níveis de mistura possam ser usados, até B100 (biodiesel puro).

[00596] A invenção também proporciona processos usando enzimas da presente invenção para a fabricação de biocombustíveis (incluindo bioálcoois, tais como bioetanol, biobutanol ou biopropanol ou biodiesel) a partir de composições compreendendo uma biomassa, por exemplo, uma fonte derivada de planta, tal como uma biomassa lignocelulósica. O material de biomassa pode ser obtido de safras agrícolas, como um subproduto da produção de alimento ou ração ou como produtos residuais, incluindo produtos residuais lignocelulósicos, tais como resíduos de planta, papel residual ou resíduos ou restos de construção e/ou demolição. Exemplos de fontes vegetais ou resíduos de planta adequados para tratamento com os polipeptídeos da invenção incluem laminária, algas, grãos, sementes, caules, folhas, cascas, sabugos de milho, ensilagem de milho, palha, cana-de-açúcar, bagaço de cana-de-açúcar, gramíneas (por exemplo, grama Indiana, tal como *Sorghastrum nutans* ou gramínea, por exemplo, espécies *Panicum*, tal como *Panicum virgatum*) e semelhantes, bem como madeira, lascas de madeira,

polpa de madeira e serragem. Exemplos de resíduos de papel adequados para tratamento com os polipeptídeos da invenção incluem papel de fotocópia descartado, papel de impressora de computador, papel de caderno, papel de agenda, papel de máquina de escrever e semelhantes, bem como jornais, revistas, papelão e materiais de embalagem baseados em papel. Exemplos de resíduos e restos de construção e demolição incluem madeira, recortes de madeira, aparas de madeira e serragem.

[00597] Em uma modalidade, as enzimas, incluindo a mistura de enzimas ou "coquetéis" da invenção e métodos da invenção podem ser usados em conjunto com meios mais "tradicionais" de fabricação de etanol, metanol, propanol, butanol, propanol e/ou diesel de biomassa, por exemplo, como métodos compreendendo hidrólise de materiais lignocelulósicos submetendo o material lignocelulósico seco em um reator a um catalisador compreendido de uma solução diluída de um ácido forte e um sal de metal; isso pode diminuir a energia de ativação ou a temperatura da hidrólise de celulose para obter maiores rendimentos de açúcar; veja, por exemplo, Patentes U.S. Nos. 6.660.506 e 6.423.145.

[00598] Outro método exemplificativo que incorpora o uso das enzimas da invenção, incluindo a mistura de enzimas ou "coquetéis" da invenção compreende hidrólise de uma biomassa, incluindo qualquer material lignocelulósico, por exemplo, contendo hemicelulose, celulose e lignina ou qualquer outro polissacarídeo que pode ser hidrolisado, submetendo o material a uma primeira etapa de hidrólise em um meio aquoso em uma temperatura e uma pressão escolhidas para realizar primariamente despolimerização de hemicelulose sem grande despolimerização de celulose em glicose. Essa etapa resulta em uma pasta na qual a fase aquosa líquida contém monossacarídeos dissolvidos resultantes

da despolimerização de hemicelulose e uma fase sólida contendo celulose e lignina. Uma segunda etapa de hidrólise pode compreender condições de modo que pelo menos uma porção principal da celulose é despolimerizada, tal etapa resultando em uma fase aquosa líquida contendo produtos de despolimerização dissolvidos/solúveis de celulose. veja, por exemplo, Patente U.S. No. 5.536.325. Enzimas da invenção (incluindo as misturas ou "coquetéis" de enzimas da invenção) podem ser adicionadas em qualquer estágio desse processo exemplificativo.

[00599] Outro método exemplificativo que incorpora o uso de enzimas da invenção, incluindo a mistura de enzimas ou "coquetéis" da invenção compreende processamento de um material de biomassa contendo lignocelulose através de um ou mais estágios de hidrólise com ácido diluído com cerca de 0,4% a 2% de ácido forte; e tratamento de um componente lignocelulósico sólido não reagido do material de biomassa hidrolisado através de delignificação alcalina para produzir precursores para termoplásticos biodegradáveis e derivados. Veja, por exemplo, Patente U.S. No. 6.409.841. As enzimas da invenção podem ser adicionadas em qualquer estágio desse processo exemplificativo.

[00600] Outro método que incorpora o uso de enzimas da invenção, incluindo a mistura de enzimas ou "coquetéis" da invenção compreende material lignocelulósico pré-hidrólise em um reator de pré-hidrólise; adição de um líquido ácido ao material lignocelulósico sólido para fazer uma mistura; aquecimento da mistura para a temperatura de reação; manutenção da temperatura de reação durante um tempo suficiente para fracionar o material lignocelulósico em uma porção solubilizada contendo pelo menos cerca de 20% da lignina do material lignocelulósico e uma fração sólida contendo celulose; remoção de uma porção solubilizada da fração sólida

enquanto em ou próximo da temperatura de reação, em que a celulose na fração sólida é tornada mais passível à digestão enzimática; e recuperação de uma porção solubilizada. Veja, por exemplo, Patente U.S. No. 5.705.369. As enzimas da invenção podem ser adicionadas em qualquer estágio nesse processo exemplificativo.

[00601] A invenção proporciona métodos para a fabricação de composições combustíveis para motor (por exemplo, para motores de ignição a centelha) baseados em hidrocarbonetos líquidos misturados com um álcool de grau combustível feito usando uma enzima ou um método da invenção. Em um aspecto, os combustíveis feitos através do uso de uma enzima da invenção compreendem, por exemplo, gás carvão líquido ou misturas de gás líquido natural-etanol. Em um aspecto, um co-solvente derivado de biomassa é 2-metiltetrahidrofurano (MTHF). Veja, por exemplo, Patente U.S. No. 6.712.866.

[00602] Em um aspecto, os métodos da invenção para a degradação enzimática de lignocelulose, por exemplo, para a produção de biocombustíveis (incluindo bioálcoois, tal como bioetanol, biometanol, biobutanol ou biopropanol ou biodiesel) a partir de material lignocelulósico também pode compreender o uso de tratamento ultra-sônico do material de biomassa; veja, por exemplo, Patente U.S. No. 6.333.181.

[00603] Em outro aspecto, os métodos da invenção para a produção de biocombustíveis (incluindo bioálcoois, tal como bioetanol, biometanol, biobutanol ou biopropanol ou biodiesel) a partir de um substrato celulósico compreende fornecimento de uma mistura de reação na forma de uma pasta compreendendo substrato celulósico, uma enzima da presente invenção e um agente de fermentação (por exemplo, dentro de um vaso de reação, tal como um biorreator de alimentação de sólidos semi-continuamente) e a mistura de

reação é reagida sob condições suficientes para iniciar e manter uma reação de fermentação (conforme descrito, por exemplo, no Ped. de Pat. U.S. No. 20060014260). Em um aspecto, cálculos experimentais ou teóricos podem determinar a frequência de alimentação ótima. Em um aspecto, quantidades adicionais do substrato celulósico e da enzima são fornecidas ao vaso de reação em um intervalo de acordo com a frequência de alimentação otimizada.

[00604] Um processo exemplificativo para a fabricação de biocombustíveis (incluindo bioálcoois, tal como bioetanol, biometanol, biobutanol ou biopropanol ou biodiesel) da invenção é descrito nas Pub. de Ped. de Pat. U.S. Nos. 20050069998; 20020164730; e, em um aspecto, compreende estágios de trituração da biomassa lignocelulósica (por exemplo, para um tamanho de 15-30 mm), sujeição do produto obtido a um pré-tratamento de explosão a vapor (por exemplo, em uma temperatura de 190-230 oC) durante entre 1 e 10 minutos em um reator; coleta do material pré-tratado em um ciclone ou produto de fabricação relacionado; e separação das frações líquida e sólida através de filtração em uma prensa de filtro, introdução da fração sólida em um depósito de fermentação e adição de uma ou mais enzimas da invenção, por exemplo, uma enzima celulase e/ou e beta-glicosidade (por exemplo, dissolvida em tampão de citrato, pH de 4,8).

[00605] Outro processo exemplificativo para a fabricação de biocombustíveis (incluindo bioálcoois, tal como bioetanol, biometanol, biobutanol ou biopropanol ou biodiesel) da invenção compreendendo bioetanol, biometanol, biobutanol ou biopropanol usando as enzimas da invenção compreende pré-tratamento de um material de iniciação compreendendo um estoque de alimentação lignocelulósico compreendendo pelo menos hemicelulose e celulose. Em um aspecto, o material de iniciação

compreende batatas, soja (colza), cevada, centeio, milho, aveias, trigo, beterrabas ou cana-de-açúcar ou um componente ou resíduo ou subproduto da produção de alimento e ração. O material de iniciação ("estoque de alimentação") é reagido em condições as quais rompem a estrutura fibrosa da planta para realizar pelo menos uma hidrólise parcial da hemicelulose e celulose. Condições para ruptura podem compreender, por exemplo, sujeição do material de iniciação a uma temperatura média de 180 oC a 270 oC em um pH de 0,5 a 2,5 durante um período de cerca de 5 segundos a 60 minutos; ou temperatura de 220 oC a 270 oC, em um pH de 0,5 a 2,5 durante um período de 5 segundos a 120 segundos ou equivalente. Isso gera um estoque de alimentação com acessibilidade aumentada ao ser digerido por uma enzima, por exemplo, uma enzima celulase da invenção. Patente U.S. No. 6.090.595.

[00606] Condições exemplificativas para uso das enzimas da invenção na hidrólise de material lignocelulósico incluem reações em temperaturas entre cerca de 30 oC e 48 oC e/ou um pH entre cerca de 4,0 e 6,0. Outras condições exemplificativas incluem uma temperatura entre cerca de 30 oC e 60 oC e um pH entre cerca de 4,0 e 8,0.

[00607] Glucanases (ou celulases), mananases, xilanases, amilases, xantanases e/ou glicosidases, por exemplo, celobiohidrolases, mananases e/ou beta-glicosidases podem ser usadas na conversão de biomassa em combustíveis e na produção de etanol, por exemplo, conforme descrito nos Pedidos PCT Nos. WO0043496 e WO8100857. Glucanases (ou celulases), mananases, xilanases, amilases, xantanases e/ou glicosidases, por exemplo, celobiohidrolases, mananases e/ou beta-glicosidases podem ser usadas em combinação com fitase (por exemplo, enzimas da invenção) para produzir açúcares fermentáveis e biomassa contendo glicana que pode ser convertida

em etanol combustível. Amilases, glicoamilases, pulunases, glicoisomerase, alfa-glicosidade e semelhantes podem ser usadas em combinação com fitase (por exemplo, enzimas da invenção) para converter amido em açúcar fermentável ou etanol. Por favor, veja Pedido PCT No. WO2005/096804.

Processamento de grão seco de destilaria

[00608] Em outro aspecto, as enzimas da invenção podem ser usadas para tratar/processar "solúveis secos de destilaria (DDS)", "grãos secos de destilaria (DDS)", "solúveis de destilaria condensados (CDS)", "grãos úmidos de destilaria (DWG)" e "grãos secos de destilaria com solúveis (DDGS)"; grãos secos de destilaria podem ser um subproduto de cereal de um processo de destilação e podem incluir solúveis. Esses processos podem compreender subprodutos de planta trituradas a seco, por exemplo, para aplicações em ração, por exemplo, para aves, bovinos, suínos e outros animais domésticos. Assim, as enzimas da invenção podem ser usadas para tratar/processar grãos, por exemplo, cereais, que são subprodutos de qualquer processo de destilação, incluindo processos usando qualquer fonte de grão, por exemplo, as fontes tradicionais para fermentação ou, alternativamente, de uma fábrica que produz etanol (usina, moinho ou semelhante). As enzimas da invenção podem ser usadas para tratar/processar massa de secagem de destilarias; essa massa pode ser subsequentemente usada para uma variedade de finalidades, por exemplo, como forragem para criações, especialmente ruminantes; assim, a invenção proporciona métodos para processamento de forragem para animais de criação, tais como ruminantes e forragem processada por enzima compreendendo as fitases da presente invenção.

[00609] As fitases da presente invenção podem ser usadas sozinhas ou com outras enzimas para processar "solúveis secos de destilaria (DDS)",

"grãos secos de destilaria (DDS)", "solúveis de destilaria condensados (CDS)", "grãos úmidos de destilaria (DWG)" e "grãos secos de destilaria com solúveis (DDGS)". Por exemplo, as fitases da presente invenção podem ser usadas em qualquer etapa de um processo de produção de álcool, conforme ilustrado na Figura 14. As fitases da presente invenção podem ser usadas para aumentar a biodisponibilidade de fósforo em qualquer biocombustível ou biocombustível potencial, incluindo o fósforo encontrado em "solúveis secos de destilaria (DDS)", "grãos secos de destilaria (DDS)", "solúveis de destilaria condensados (CDS)", "grãos úmidos de destilaria (DWG)" e "grãos secos de destilaria com solúveis (DDGS)" (veja, por exemplo, C. Martinez Amezcua, 2004 Poultry Science 83: 971-976).

Produção de álcool bebível ou bebidas gaseificadas

[00610] As fitases da presente invenção também podem ser usadas no processamento de grãos secos de destilaria para a produção de álcool - álcool como em "bebidas gaseificadas", por exemplo, produção de cerveja ou whiskey (além de uso em processamento de biomassa para a fabricação de biocombustíveis). As fitases da presente invenção podem ser usadas em fábricas de etanol, por exemplo, para processamento de grãos, tal como milho. Grãos secos de destilaria podem ser feitos primeiro triturando um grão (por exemplo, milho) até uma consistência espessa e adição de água quente. Após esfriar, o levedo é adicionado e a mistura fermenta durante vários dias a uma semana. Os sólidos restantes após fermentação são os grãos de destilaria. As fitases da presente invenção podem ser usadas em qualquer etapa desse processo.

Formulações

[00611] A invenção proporciona novas formulações compreendendo fitases, por exemplo, conforme aquelas descritas aqui e formulações para

fitases, incluindo formulações as quais incluem as novas fitases da invenção. As fitases da invenção podem ser usadas ou formuladas sozinhas ou como mistura de fitases ou fitases e outras enzimas, tais como xilanases, celulasas, proteases, lipases, amilases ou enzimas redox tais como lacases, peroxidases, catalases, oxidases ou reductases. Elas podem ser formuladas em uma forma sólida, tal como um pó, um preparado liofilizado, um grânulo, um comprimido, uma barra, um cristal, uma cápsula, uma pílula, um pélete ou em uma forma líquida, tal como em uma solução aquosa, um aerossol, um gel, uma pasta, uma emulsão aquosa/oleosa, um creme, uma cápsula ou em uma suspensão vesicular ou micelar. As formulações da invenção podem compreender qualquer uma ou uma combinação dos seguintes ingredientes: polióis tais como polietileno glicol, um álcool polivinílico, um glicerol, um açúcar tal como uma sacarose, um sorbitol, uma trealose, uma glicose, uma frutose, uma maltose, uma manose, um agente de gelificação, tal como uma goma guar, uma carregenana, um alginato, uma dextrana, um derivado celulósico, uma pectina, um sal tal como cloreto de sódio, um sulfato de sódio, um sulfato de amônio, um cloreto de cálcio, um cloreto de magnésio, um cloreto de zinco, um sulfato de zinco, um sal de um ácido graxo e um derivado de ácido graxo, um quelador de metal, tal como EDTA, EGTA, um citrato de sódio, um agente antimicrobiano, tal como ácido graxo ou um derivado de ácido graxo, um parabeno, um sorbato, um benzoato, um composto de modulação adicional para bloquear o impacto de uma enzima, tal como uma protease, uma proteína densa, tal como BSA, um hidrolisato de trigo, um composto de borato, um aminoácido ou um peptídeo, um composto para modulação de temperatura ou pH apropriado, um emulsificante, tal como um detergente não-iônico e/ou iônico, um agente de redox tal como uma cistina/cisteína, uma glutatona, uma glutatona oxidada,

um composto reduzido ou um antioxidante, tal como ácido ascórbico, uma cera ou óleo ou um dispersante. Modificação e reticulação de proteína, tal como peguilação, modificação de ácido graxo, glicosilação também podem ser usados para melhorar a estabilidade da enzima.

Medição de Parâmetros Metabólicos

[00612] Os métodos da invenção envolvem evolução de célula inteira ou manipulação de célula inteira de uma célula para desenvolver uma nova cepa de célula tendo um novo fenotipo através de modificação da composição genética da célula, onde a composição genética é modificada através da adição, à célula, de um ácido nucleico da invenção. Para detectar o novo fenotipo, pelo menos um parâmetro metabólico de uma célula modificada é monitorado na célula em uma estrutura de "tempo real" ou tempo "on-line". Em um aspecto, uma pluralidade de células, tal como uma cultura de célula, é monitorada em "tempo real" ou "on-line". Em um aspecto, uma pluralidade de parâmetros metabólicos é monitorada em "tempo real" ou "on-line".

[00613] Análise de fluxo metabólico (MFA) é baseada em uma estrutura bioquímica conhecida. Uma matriz metabólica linearmente independente é construída baseada na lei de conservação de massa e sobre a hipótese de estado pseudo-uniforme (PSSH) sobre metabólitos intracelulares. Na prática dos métodos da invenção, redes metabólicas são estabelecidas, incluindo:

- identidade de todos os substratos da via, produtos e metabólitos intermediários,
- identidade de todas as reações químicas de interconversão dos metabólitos da via, a estequiometria das reações da via,
- identidade de todas as enzimas que catalisam as reações, a

cinética de reação da enzima,

- as interações regulatórias entre componentes da via, por exemplo, interações alostéricas, interações de enzima-enzima, etc.,
- compartimentalização intracelular de enzimas ou qualquer outra organização supramolecular das enzimas e
- a presença de quaisquer gradientes de concentração de metabólitos, enzimas ou moléculas efetadoras ou barreiras de difusão a sua movimento.

[00614] Uma vez que a rede metabólica para uma determinada cepa é construída, apresentação matemática através de noção de matriz, pode ser introduzida para estimar os fluxos metabólicos intracelulares se os dados de metaboloma on-line estão disponíveis.

[00615] O fenotipo metabólico conta com alterações da rede metabólica inteira dentro de uma célula. O fenotipo metabólico conta com as alterações de utilização de via com relação às condições ambientais, regulação genética, estado de desenvolvimento e o genotipo, etc. Em um aspecto dos métodos da invenção, após cálculo de MFA on-line, o comportamento dinâmico das células, seu fenotipo e outras propriedades são analisadas através de investigação da utilização de via. Por exemplo, se o fornecimento de glicose é aumentado e o oxigênio diminuído durante a fermentação de levedo, a utilização de vias respiratórias será reduzida e/ou parada e a utilização das vias fermentativas dominará. Controle de estado fisiológico de culturas de células se tornará possíveis após a análise de via. Os métodos da invenção podem ajudar a determinar como manipular a fermentação determinando como mudar o suprimento de substrato, temperatura, uso de indutores, etc. para controlar o estado fisiológico das células para se mover ao longo da direção desejável. Na prática dos métodos

da invenção, os resultados de MFA também podem ser comparados com dados transcriptoma e proteoma para criar experimentos e protocolos para engenharia metabólica ou embaralhamento de gene, etc.

[00616] Na prática dos métodos da invenção, qualquer fenotipo novo ou modificado pode ser conferido e detectado, incluindo características novas ou aperfeiçoadas na célula. Qualquer aspecto do metabolismo ou crescimento pode ser monitorado.

Monitoramento de expressão de um transcrito de mRNA

[00617] Em um aspecto da invenção, o fenotipo manipulado compreende aumento ou diminuição da expressão de um transcrito de mRNA ou geração de novos transcritos em uma célula. Transcrito de mRNA ou mensagem pode ser detectado e quantificado através de qualquer método conhecido na técnica, incluindo, por exemplo, Northern blots, reações de amplificação quantitativas, hibridização a arranjos e semelhantes. Reações de amplificação quantitativa incluem, por exemplo, PCR quantitativa incluindo, por exemplo, reação em cadeia de polimerase por transcrição reversa quantitativa ou RT-PCR; RT-PCR em tempo real quantitativa ou "RT-PCR cinética em tempo real" (veja, por exemplo, Kreuzer (2001) Br. J. Haematol. 114: 313-318; Xia (2001) Transplantation 72: 907-914).

[00618] Em um aspecto da invenção, o fenotipo manipulado é gerado através de knocking out da expressão de um gene homólogo. A sequência de codificação do gene ou um ou mais elementos de controle transcricionais pode sofrer knocking out, por exemplo, promotores e intensificadores. Assim, a expressão de um transcrito pode ser completamente eliminada ou apenas diminuída.

[00619] Em um aspecto da invenção, o fenotipo manipulado compreende aumento da expressão de um gene homólogo. Isso pode ser

realizado através de knocking out de um elemento de controle negativo, incluindo um elemento regulatório de transcrição de cis- ou trans-atuação ou mutagênese de um elemento de controle positivo.

[00620] Conforme discutido abaixo em detalhes, um ou mais ou todos os transcritos de uma célula podem ser medidos através de hibridização de uma amostra compreendendo transcritos da célula ou ácidos nucleicos representativos de ou complementares aos transcritos de uma célula, através de hibridização a ácidos nucleicos imobilizados sobre um arranjo.

Monitoramento expressão de um polipeptídeo, peptídeo e aminoácidos

[00621] Em um aspecto da invenção, o fenotipo manipulado compreende aumento ou diminuição da expressão de um polipeptídeo ou geração de novos polipeptídeos em uma célula. Polipeptídeos, peptídeos e aminoácidos podem ser detectados e quantificados através de qualquer método conhecido na técnica incluindo, por exemplo, ressonância magnética nuclear (NMR), espectrofotometria, radiografia (radio-rotulação de proteína), eletroforese, eletroforese capilar, cromatografia de líquido de alto desempenho (HPLC), cromatografia em camada fina (TLC), cromatografia por hiperdifusão, vários métodos imunológicos, por exemplo, imunoprecipitação, imunodifusão, imuno-eletroforese, radioimunoensaios (RIAs), ensaios imunoabsorventes enzima-ligados (ELISAs), ensaios imuno-fluorescentes, eletroforese em gel (por exemplo, SDS-PAGE), coloração com anticorpos, seleção de célula fluorescência-ativada (FACS), espectrometria de massa por pirólise, Espectrometria por Infravermelho por Transformação de Fourier, espectrometria de Raman, espectrometrias GC-MS e LC-Eletropulverização e cap-LC-eletropulverização de massa aleatória e semelhantes. Novas bioatividades também podem ser selecionadas usando métodos ou variações dos mesmos descritos na Patente U.S. No. 6.057.103.

Além disso, conforme discutido abaixo em detalhes, um ou mais ou todos os polipeptídeos de uma célula podem ser medidos usando um ensaio de proteína.

[00622] ¹³C rotulação fracional biossinteticamente dirigida de aminoácidos proteinogênicos pode ser monitorada através de alimentação de uma mistura de compostos fonte de carbono não rotulados e ¹³C-rotulados uniformemente em uma estrutura de bio-reação. Análise do padrão de rotulação resultante permite uma caracterização abrangente da topologia de estrutura e a determinação de proporções de fluxo metabólico dos aminoácidos; veja, por exemplo, Szyperski (1999) Metab. Eng. 1: 189-197.

[00623] Os exemplos a seguir se destinam a ilustrar, mas não limitar, a invenção. Embora os procedimentos descritos nos exemplos sejam típicos daqueles que podem ser usados para realizar determinados aspectos da invenção, outros procedimentos conhecidos por aqueles versados na técnica também podem ser usados.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Caracterização de atividade de fitases exemplificativas da invenção

[00624] Esse exemplo descreve a caracterização de atividade de fitase dos polipeptídeos da invenção, os quais são modificações de sequência (as assim denominadas fitases "evoluídas") da fitase precursora SEQ ID NO: 2 e um ensaio de atividade de fitase exemplificativo. Esse ensaio de atividade de fitase pode ser usado para determinar se um polipeptídeo tem atividade suficiente para estar dentro do escopo da invenção reivindicada.

[00625] Após geração dos polipeptídeos da invenção através de expressão das sequências de ácido nucleico GSSM-modificadas da invenção, os polipeptídeos de fitase "evoluídos" - apenas espécies exemplificativas

com uma mutação em um único resíduo nesse estudo - foram purificados e, então, termicamente tratados (pH de 7,0, Tween a 0,01%) em várias temperaturas durante 30 minutos. Após a etapa de tratamento térmico, as amostras (20 µL) foram ensaiadas com o substrato fluorescente (180 µL) DiFMUP a 4 mM em um pH de 5,5. As taxas foram comparadas com as taxas de cada amostra não tratada correspondente. Os resultados são ilustrados na Figura 5.

[00626] Em outro estudo, as fitases "evoluídas" da invenção compreendendo mutações únicas "misturadas", isto é, fitases contendo múltiplas mutações, foram crescidas durante a noite em LBCARB100™ (LBcarb100) a 30°C. 100 µL de cada cultura (mutante misturado) foram tratados termicamente sobre um termociclizador de 72 oC a 100 oC. 20 µL da cultura termicamente tratada foram misturados com 180 µL de DiFMUP a 4 mM em um pH de 5,5. As taxas foram comparadas com as taxas de cada amostra não tratada correspondente; conforme resumido na Figura 6. A tabela ilustrada na Figura 7 resume graficamente os dados (arredondados para o décimo mais próximo) usados para gerar o gráfico da Figura 6.

[00627] As amostras 1 a 21 correspondem às mutações únicas "misturadas" da SEQ ID NO: precursora, conforme ilustrado no gráfico da Figura 9; note que a fitase "evoluída" número 10 tem uma modificação de resíduo na sequência (com relação à SEQ ID NO: 2) que não foi introduzida por GSSM; essa mutação foi introduzida através de escolha aleatória e pode ou não ter qualquer relevância para a estabilidade térmica dessa fitase exemplificativa da invenção. Também, note que as fitases exemplificativas marcadas ** 19, 20 e 21 têm tags de histidina C-terminais (6xHis) (-RSHHHHHH). A Figura 9 ilustra fitases exemplificativas tendo múltiplas modificações de resíduo com relação à SEQ ID NO: 2 precursora; conforme

descrito em detalhes aqui. A Figura 10 ilustra fitases exemplificativas tendo modificações de um único resíduo com relação à SEQ ID NO: 2 precursora, conforme descrito em detalhes aqui.

[00628] A Figura 11 ilustra esquematicamente um ensaio de fitase exemplificativo da invenção usando o substrato fluorescente fosfato de 4-metilumbeliferila (MeUMB-fosfato, cuja estrutura também é ilustrada): (i) a fitase é termicamente estimulada durante 20 minutos, 72 oC, pH de 4,5; e, a 80 oC em um pH fisiológico (pH de 7,4); e (ii) atividade residual é testada a 37 oC, pH de 4,5:

- medir a atividade residual em pH alto e baixo,
- calcular a atividade residual com relação ao tipo selvagem após tratamento térmico.

[00629] A Figura 12 ilustra esquematicamente outro ensaio de fitase exemplificativo da invenção que também usa o substrato fluorescente MeUMB-fosfato: (i) a fitase é termicamente estimulada durante 30 minutos, 86 oC, pH de 5,5; e (ii) a atividade residual é testada a 37 oC, pH de 4,5:

- medir a atividade residual com relação ao controle de variante 6X,
- selecionar "hits" e re-ensaiar em maior estringência para selecionar variantes superiores.

[00630] Esse ensaio foi usado para selecionar bibliotecas de variantes de GSSM (de SEQ ID NO: 1) ensaiando a atividade de fitase dos polipeptídeos que elas codificam. A Figura 13 ilustra esquematicamente o protocolo para seleção dessa biblioteca (conforme descrito na Figura 12), onde o tamanho da biblioteca selecionada

REIVINDICAÇÕES

1. Ácido nucleico sintético, recombinante ou isolado, caracterizado pelo fato de que consiste em:

(a) (i) uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipeptídeo tendo uma atividade de fitase como definida na SEQ ID NO: 1 e contendo modificações da sequência de pares de bases de nucleotídeos para SEQ ID NO: 1, selecionadas a partir do grupo consistindo:

os nucleotídeos nas posições 139 até 141 são TTT ou TTC;

os nucleotídeos nas posições 289 até 291 são GTT, GTC, GTA ou GTG;

os nucleotídeos nas posições 289 até 291 são GAA ou GAG;

os nucleotídeos nas posições 406 até 408 são CAT ou CAC;

os nucleotídeos nas posições 475 até 477 são CTT, GTC, GTA ou GTG;

os nucleotídeos nas posições 475 até 477 são GAA ou GAG;

os nucleotídeos nas posições 487 até 489 são CGT, CGC, CGA, CGG, AGA ou AGC;

os nucleotídeos nas posições 490 até 492 são CGT, CGC, CGA, CGG, AGA ou AGC;

os nucleotídeos nas posições 502 até 504 são CGT, CGC, CGA, CGG, AGA ou AGC;

os nucleotídeos nas posições 535 até 537 são CGT, CGC, CGA, CGG, AGA ou AGG;

os nucleotídeos nas posições 676 até 678 são GAT ou GAC;

os nucleotídeos nas posições 697 até 699 são TGG;

os nucleotídeos nas posições 823 até 825 são GIT, GTC, GTA ou GTG;

os nucleotídeos nas posições 865 até 867 são GCT, GCC, GCA ou GCG;

os nucleotídeos nas posições 1045 até 1047 são TAT ou TAC; e

os nucleotídeos nas posições 1087 até 1089 são CCA, CCC, CCC ou CCT.

2. Cassete de expressão, vetor, veículo de clonagem, vetor de expressão, vetor de clonagem (i), caracterizados pelo fato de que compreende um ácido nucleico como definido na reivindicação 1; ou (ii) o cassete de expressão, o vetor, o veículo de clonagem, o vetor de expressão, o vetor de clonagem de (i), onde o veículo de clonagem contém ou é um vetor viral, um plasmídeo, um fago, um fagemídeo, um cosmídeo, um fosmídeo, um bacteriófago ou um cromossomo artificial e opcionalmente o vetor viral contém um vetor de adenovírus, vetores retrovirais ou um vetor viral associado a adeno e opcionalmente o cassete de expressão, o vetor, o veículo de clonagem, o vetor de expressão, o vetor de clonagem contém ou está contido em um cromossomo artificial de bactéria (BAC), um plasmídeo, um vetor derivado do bacteriófago PI (PAC), um cromossomo artificial de levedura (YAC), um cromossomo artificial de mamífero (MAC).

3. Microrganismo transgênico (i), caracterizado pelo fato de que compreende: um ácido nucleico, como definido na reivindicação 1, ou o cassete de expressão, o vetor, o veículo de clonagem, o vetor de expressão, o vetor de clonagem, como definidos na reivindicação 2; ou

(ii) a célula transformada ou a célula hospedeira do (i) microrganismo transgênico é uma célula bacteriana, ou uma célula fúngica; (iii) a célula bacteriana de (ii) é qualquer espécie dentro dos gêneros *Escherichia*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Salmonella*, *Pseudomonas* ou

Staphylococcus ou *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* ou *Pseudomonas fluorescens*.

4. Polipeptídeo de fitase sintético, recombinante ou isolado, caracterizado pelo fato de que consiste em:

(a) uma sequência de aminoácidos contendo modificações nos resíduos de aminoácidos na SEQ ID NO: 2, selecionadas do grupo que consiste em:

o aminoácido alanina na posição de aminoácido 47 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma fenilalanina;

o aminoácido cisteína na posição de aminoácido 97 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma valina;

o aminoácido cisteína na posição de aminoácido 97 da SEQ ID NO: 2 é alterado para um ácido glutâmico;

o aminoácido no equivalente da treonina na posição de aminoácido 136 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma histidina;

o aminoácido asparagina na posição de aminoácido 159 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma valina;

o aminoácido asparagina na posição de aminoácido 159 da SEQ ID NO: 2 é alterado para um ácido glutâmico;

o aminoácido no equivalente da treonina na posição de aminoácido 163 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma arginina;

o aminoácido ácido aspártico na posição de aminoácido 164 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma arginina;

o aminoácido ácido glutâmico na posição de aminoácido 168 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma arginina;

o aminoácido glicina na posição de aminoácido 179 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma arginina;

o aminoácido cisteína na posição de aminoácido 226 da SEQ ID NO: 2 é alterado para um ácido aspártico;

o aminoácido valina na posição de aminoácido 233 da SEQ ID NO: 2 é alterado para um triptofano;

o aminoácido glutamina na posição de aminoácido 275 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma valina;

o aminoácido arginina na posição de aminoácido 289 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma alanina;

o aminoácido treonina na posição de aminoácido 349 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma tirosina; e

o aminoácido leucina na posição de aminoácido 363 da SEQ ID NO: 2 é alterado para uma prolina; ou

(b) o polipeptídeo de (a), onde (i) o polipeptídeo é glicosilado ou o polipeptídeo contém um sítio de glicosilação, (ii) o polipeptídeo de (i) onde a glicosilação é uma glicosilação ligada a N ou uma glicosilação ligada a O; (iii) o polipeptídeo de (i) ou (ii) onde o polipeptídeo é glicosilado após ser expresso em uma célula de levedura; ou (iv) o polipeptídeo de (iii) onde a célula de levedura é uma *P. pastoris* ou uma *S. pombe*.

5. Polipeptídeo imobilizado ou ácido nucleico imobilizado, caracterizado pelo fato de que (i) o polipeptídeo é como definido na reivindicação 4, ou o ácido nucleico é como definido na reivindicação 1; ou (ii) o polipeptídeo ou ácido nucleico é imobilizado sobre ou dentro de um filme, um metal, uma resina, um polímero, uma cerâmica, um vidro, um microeletrodo, uma partícula grafitica, uma esfera, um gel, uma placa, um arranjo, um tubo capilar, um cristal, um comprimido, uma pílula, uma cápsula, um pó, um aglomerado ou uma superfície.

6. Processo de produção de um polipeptídeo recombinante, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) fornecer um ácido nucleico;

onde o ácido nucleico consiste em uma sequência como definida na reivindicação 1; e

(b) expressar o ácido nucleico da etapa (a) sob condições que permitam a expressão do polipeptídeo, produzindo assim um polipeptídeo recombinante,

e opcionalmente o processo compreende ainda a transformação de uma célula hospedeira com o ácido nucleico da etapa (a) seguida pela expressão do ácido nucleico da etapa (a), produzindo assim o polipeptídeo recombinante em uma célula hospedeira transformada.

7. Processo para hidrolisar um inositol-hexafosfato em inositol e fosfato inorgânico, caracterizado pelo fato de que compreende:

(i) (a) fornecer um polipeptídeo tendo uma atividade de fitase, em que o polipeptídeo consiste uma sequência de aminoácidos, como definida na reivindicação 4;

(b) fornecer uma composição compreendendo um inositol-hexafosfato; e

(c) colocar em contato o polipeptídeo da etapa (a) com a composição da etapa (b) sob condições em que o polipeptídeo hidrolisa o inositol-hexafosfato para produzir inositol e fosfato inorgânico;

(ii) o processo de (i), em que as condições compreendem uma temperatura de entre 37°C e 70°C, entre 50°C e 80°C ou entre 60°C e 90°C; ou

(iii) o processo de (i) ou (ii), em que a composição contém um ácido fítico.

8. Processo para degomagem de óleo, caracterizado pelo fato de que contém:

(a) fornecer um polipeptídeo tendo uma atividade de fitase, em que o polipeptídeo consiste em uma sequência de aminoácidos, como definida na reivindicação 4;

(b) fornecer uma composição compreendendo um óleo vegetal; e

(c) colocar em contato o polipeptídeo da etapa (a) e o óleo vegetal da etapa (b) sob condições onde o polipeptídeo pode clivar uma ligação de inositol-fosfato inorgânico, eliminando assim a goma do óleo vegetal.

9. Processo para produção de um alimento, produto alimentício ou suplemento alimentar para animais, caracterizado pelo fato de que compreende:

(i) (a) transformar uma planta, uma parte da planta ou uma célula vegetal com um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo da enzima fitase, em que a fitase consiste em uma sequência de aminoácidos como definida na reivindicação 4, ou um polipeptídeo codificado por um ácido nucleico como definido na reivindicação 1;

(b) cultivar a planta, parte da planta ou célula vegetal sob condições em que a enzima fitase é expressada; e

(c) converter a planta, partes da planta ou célula vegetal em uma composição adequada para alimento, produto alimentício ou suplemento alimentar para animais, ou acionar a planta, parte da planta ou célula vegetal cultivada a um alimento, produto alimentício ou suplemento alimentar para animais, produzindo assim alimento, produto alimentício ou suplemento alimentar para animais;

(ii) o processo de (i), em que o polinucleotídeo está contido em um vetor de expressão, e opcionalmente o vetor compreende uma sequência de controle da expressão capaz de expressar o ácido nucleico em uma célula vegetal;

(iii) o processo de (ii), em que o animal é um animal monogástrico e opcionalmente o animal é um ruminante;

(iv) o processo de (i), (ii) ou (iii), em que o alimento, produto alimentício ou suplemento alimentar para animais está na forma de uma matriz de fornecimento, um pélete, um comprimido, um gel, líquidos, um spray, grão triturado ou um pó;

(v) o processo de (i), (ii), (iii) ou (iv), em que a enzima fitase é glicosilada ou a enzima fitase é glicosilada para fornecer termotolerância ou termoestabilidade em condições de peletização; ou

(vi) o processo de (i), (ii), (iii), (iv) ou (v), em que a matriz de fornecimento é formada através da peletização de uma mistura compreendendo um embrião de grão e a enzima fitase para produzir uma partícula e opcionalmente os péletes são produzidos sob condições que compreendem a aplicação de vapor, opcionalmente os péletes são produzidos sob condições que compreendem a aplicação de uma temperatura em excesso de 80°C durante 5 minutos e opcionalmente o pélete compreende uma enzima fitase que tem uma atividade específica de 350 até 900 unidades por miligrama de enzima.

10. Alimento, produto alimentício ou suplemento alimentar para um animal ou um humano, (i) caracterizado pelo fato de que contém um polipeptídeo, como definido na reivindicação 4; (ii) alimento, produto alimentício ou suplemento alimentar de (i) em que o polipeptídeo é glicosilado ou a atividade de fitase é termotolerante ou termoestável; ou,

(iii) alimento, produto alimentício ou suplemento alimentar de (i) ou (ii) é produzido na forma de pélete, pílula, comprimido, cápsula, geltab, spray, pó, pasta fluida, suspensão ou líquida ou produzido utilizando aditivos revestidos com polímero ou produzido na forma granulada ou produzido através da secagem por atomização.

11. Processo para processamento de grãos de milho e de sorgo, caracterizado pelo fato de que compreende (a) fornecer um polipeptídeo que possui uma atividade de fitase, em que o polipeptídeo é como definido na reivindicação 4; (b) fornecer uma composição contendo um líquido de infusão de milho ou um líquido de infusão de sorgo; e (c) colocar em contato o polipeptídeo da etapa (a) e a composição da etapa (b) sob condições onde o polipeptídeo pode clivar uma ligação de inositol-fosfato inorgânico.

12. Composição, caracterizada pelo fato de que contém (a) um polipeptídeo como definido na reivindicação 4, onde opcionalmente o polipeptídeo é glicosilado e opcionalmente a atividade de fitase é termotolerante ou termoestável.

13. Composição de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que contém uma preparação de proteína, um fármaco, uma matriz de distribuição enzimática comestível ou absorvível, uma formulação dietética, uma unidade de refeição pronta para comer autocontida (MRE), uma bebida, um agente hidratante, um comprimido mastigável, um farelo de soja, um produto cozido ou um cereal matinal.

14. Uso de um polipeptídeo como definido na reivindicação 4, caracterizado pelo fato de ser na preparação de uma composição para melhorar (retardar o progresso de tratar ou prevenir) osteoporose, em que

opcionalmente o polipeptídeo é glicosilado e opcionalmente a atividade de fitase é termotolerante ou termoestável.

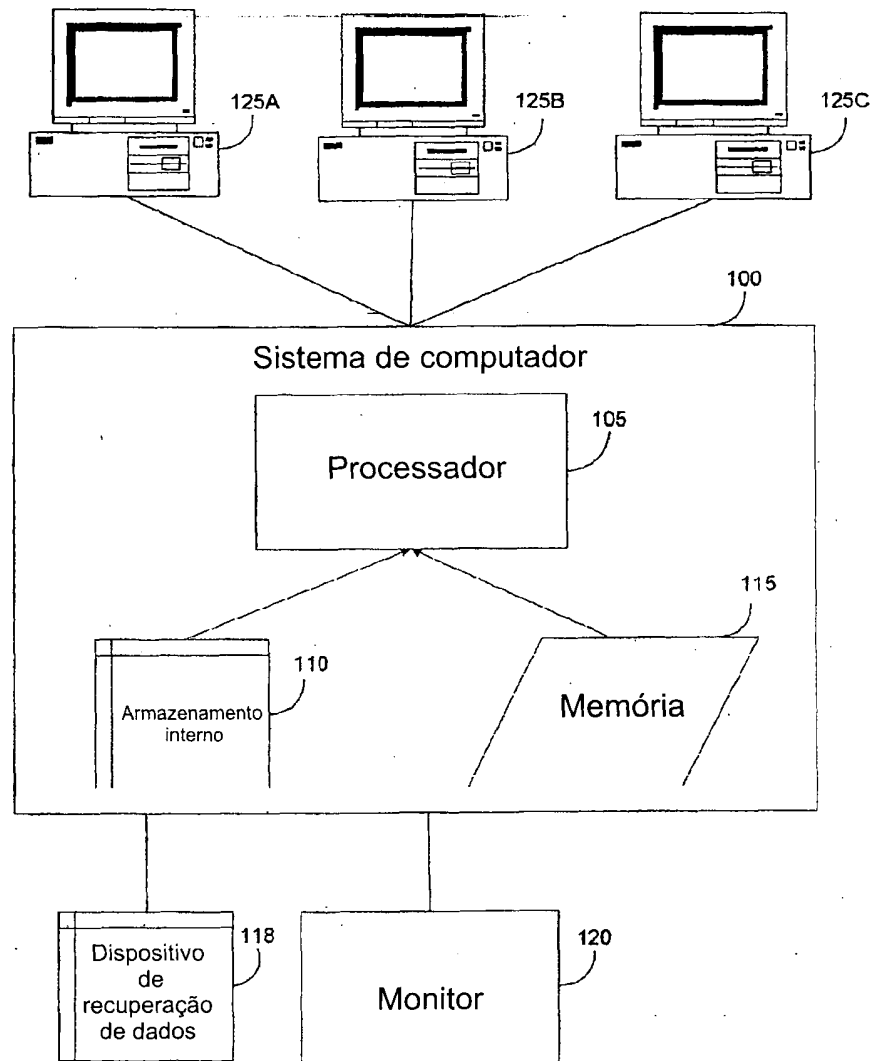


FIG. 1

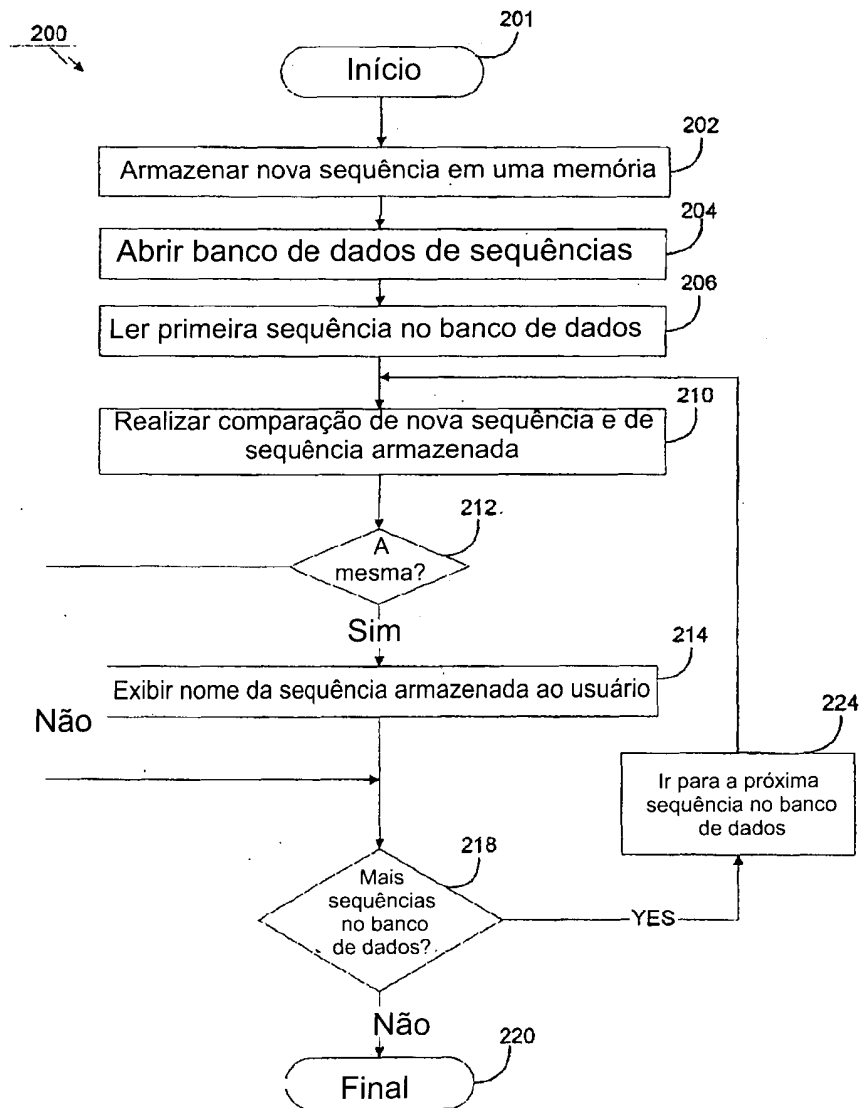


FIG. 2

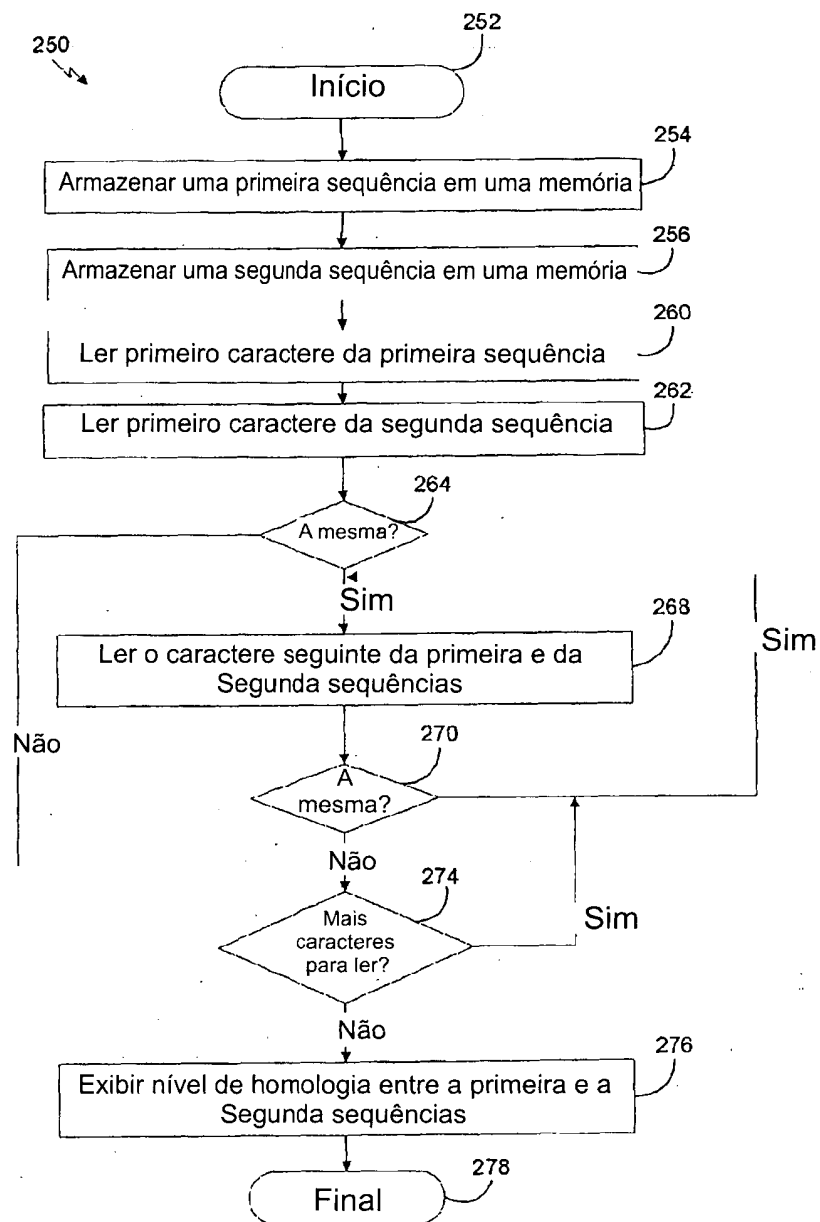


FIG. 3

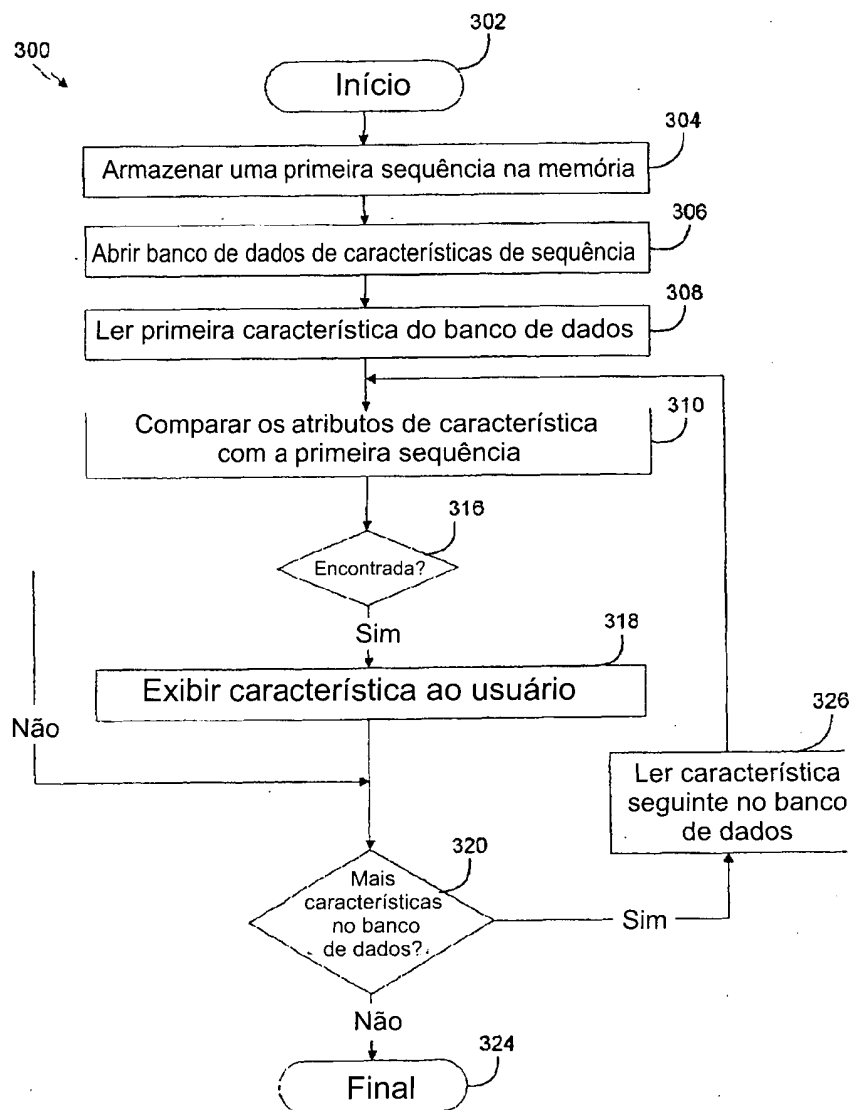


FIG. 4

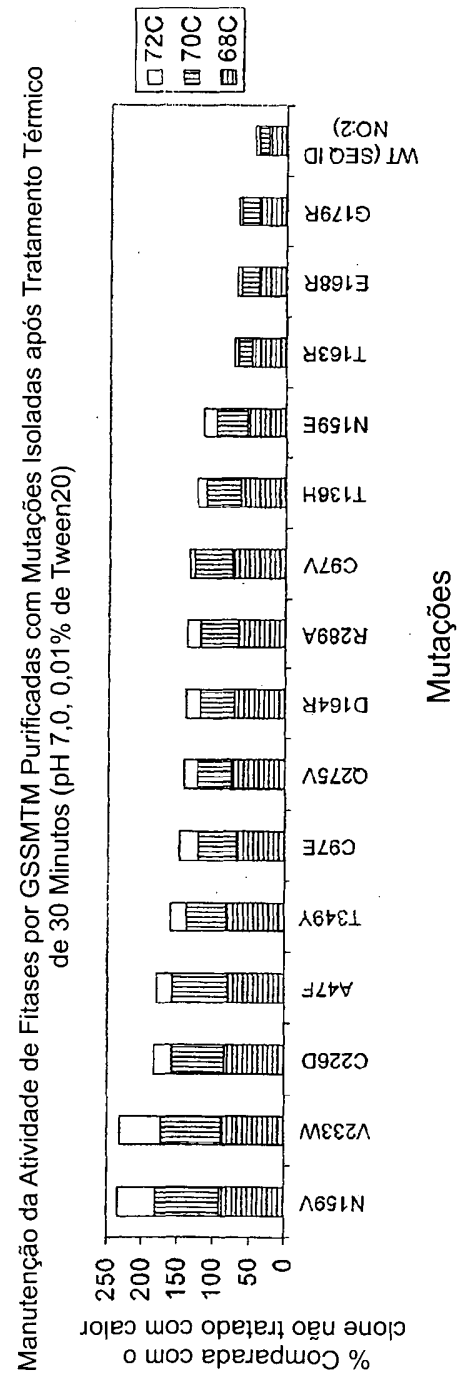
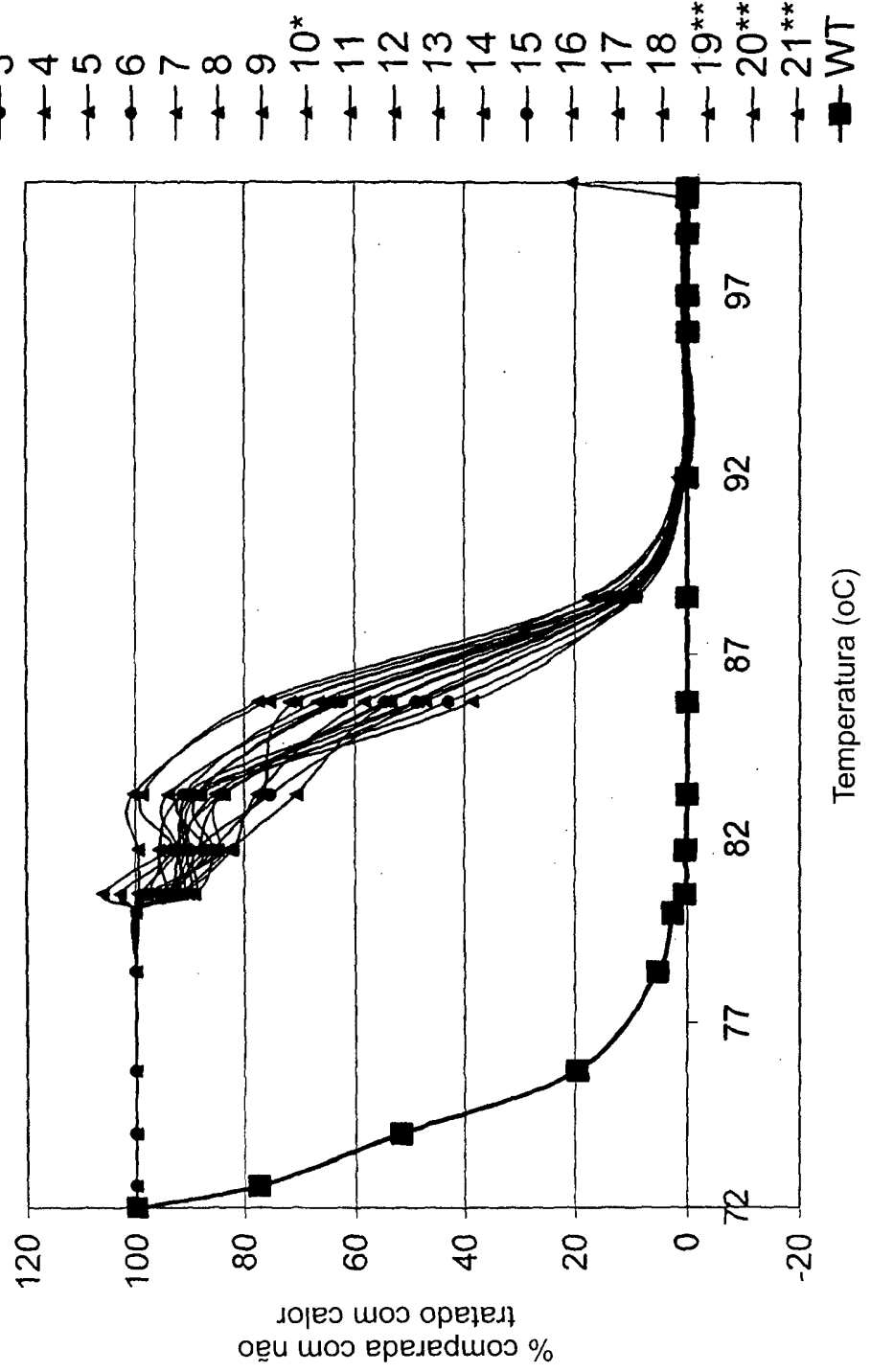


FIG. 5

FIG. 6

Manutenção da Atividade de Mutantes de Fitase por GeneReassembly™
após Tratamento Térmico de 30 min
WT = SEQ ID NO: 2



Fitase No	Temperatura (oC)																
	72	72.6	74	75.7	78.4	80	80.5	81.7	83.2	85.7	88.6	91.9	95.9	96.9	98.6	99.6	100
1	100	100	100	100	100	100	94.7	90.0	90.2	42.9	9.1	0.5	0.7	0.5	0.7	0.5	0.4
2	100	100	100	100	100	100	94.2	85.7	75.3	48.9	11.8	0.9	0.6	0.5	0.8		0.6
3	100	100	100	100	100	100	94.5	87.3	91.5	48.8				0.3	0.3		
4	100	100	100	100	100	100	94.3	92.5	94.2	63.7	11.7	1.2	0.8	0.8	0.8	0.8	0.9
5	100	100	100	100	100	100	90.3	90.8	88.9	63.3	12.1	1.1	1.0	0.9	0.9	0.8	1.0
6	100	100	100	100	100	100	98.0	93.5	84.2	54.5	12.8	1.3	0.0	0.8	0.6	0.6	1.0
7	100	100	100	100	100	100	94.6	87.3		71.7	17.6	0.7	0.2	0.2	0.1	0.3	0.2
8	100	100	100	100	100	100	99.5	99.5	100.5	75.3	14.4	0.5	0.1	0.1	0.1	0.1	0.5
9	100	100	100	100	100	100	91.8	82.2	77.5	58.2	12.2	1.4	1.1	1.0			1.2
10*	100	100	100	100	100	100	94.6	95.8	91.7	66.6	11.7	0.5	0.2	0.3	0.5	0.4	0.4
11	100	100	100	100	100	100	96.6	82.8		64.5	15.2	1.6	1.1	1.1	1.2	1.2	1.2
12	100	100	100	100	100	100	93.2	88.8	83.6	53.8	11.5	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.4
13	100	100	100	100	100	100	92.4	82.7	70.6	53.6	11.0	0.8	0.4	0.4		0.5	20.8
14	100	100	100	100	100	100	103.0	93.4	98.8	77.4	17.3	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2	0.1
15	100	100	100	100	100	100	91.7	92.2	89.4	62.2	12.9		0.2	0.3	-0.2	0.2	0.2
16	100	100	100	100	100	100	93.2	91.4	89.2	38.7	10.6	0.3	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2
17	100	100	100	100	100	100	98.0	84.7	84.3	47.0	10.1	0.2	0.2	0.2		0.2	0.2
18	100	100	100	100	100	100	89.2	85.8	88.2	48.5	9.4	0.7	0.8	0.4	0.5	0.4	0.2
19**	100	100	100	100	100	100	99.2	92.1	85.5	54.4	11.0	0.4	0.2	0.2	0.2	0.3	0.2
20**	100	100	100	100	100	100	89.4	88.8	76.6	70.6	12.2	0.3	0.2		0.2	0.2	0.2
21**	100	100	100	100	100	100	106.1	93.9		63.8	12.7	1.0	0.6	0.6	0.6	0.5	0.6
WT (SEQ ID NO:2)	100	77.4	51.7	19.5	5.29	2.6	0.4	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

FIG. 7

8/14

MKAILIPFLSLIPLTPQSAFAQSEPELKLESVVIVSRHGVRAPTKATQLMQDVTDAWPTWPKLGELT
↓
F

PRGGELIAYLGHWRLVADGLLPKCGCPQSGQVAIIADVDERTRKTGEAFAAGLAPDCAITVHTQADT
↓ ↓
E, V H

SSPDPLEFNPLKTGVCQLDNANVTDAILERAGGSIADFTGHYQTAFRELERVLFNPQSNLCLKREKQDESC
↓ ↓ ↓ ↓
E, R, V RR R R

SLTQALPSELKVSADCVSLTGAVSLASMLTEIFLLQQAQGMPEPGWGRITDSHQWNTLLSLHNAQFDLLQ
↓ ↓ ↓
D W V

RTPEVARSRATPLLDLIKLTALTPHPQKQAYGVTLPTSVLFIAGHDTNLANLGGALELNWTLPGQPDNTP
↓ ↓
A Y

PGGELVFERWRLSDNSQWIOVSLVFQTLQQMRDKTPLSLNTPPGEVKLTLAGCEERNAQGMCSLAGFTQ

IVNEARIPACSL

FIG. 8

FIG. 9

Filial desenvolvida N°	# de Mutações	Mutações Possíveis														L363P
		A47F	C97V	C97E	T136H	N159V	N159E	T163R	D164R	E168R	G179R	C226D	V233W	Q275V	R289A	T349Y
1	10X	A47F		C97E	T136H	N159V					G179R	C226D	V233W	Q275V	R289A	T349Y
2	10X	A47F		C97E	T136H	N159V		T163R	D164R		G179R	C226D	V233W	Q275V	R289A	T349Y
3	10X	A47F			T136H	N159V		T163R	D164R		G179R	C226D	V233W	Q275V		T349Y
4	12X	A47F			T136H	N159V		T163R	D164R	E168R	G179R	C226D	V233W	Q275V	R289A	T349Y
5	12X	A47F	C97V		T136H	N159V		T163R		E168R	G179R	C226D	V233W	Q275V	R289A	T349Y
6	12X	A47F	C97V		T136H	N159V		T163R	D164R	E168R	G179R	C226D	V233W	Q275V		T349Y
7	11X	A47F			T136H	N159V		T163R	D164R	E168R	G179R	C226D	V233W	Q275V		T349Y
8	11X	A47F		C97E	T136H	N159V		T163R	D164R		G179R	C226D	V233W	Q275V		T349Y
9	12X	A47F		C97E	T136H	N159V		T163R	D164R	E168R	G179R		V233W	Q275V	R289A	T349Y
10*	12X	A47F		C97E	T136H	N159V	N159E	T163R	D164R		G179R		V233W	Q275V	R289A	T349Y
11	11X	A47F	C97V		T136H	N159V		T163R	D164R		G179R		V233W	Q275V	R289A	T349Y
12	13X	A47F		C97E	T136H	N159V		T163R	D164R	E168R	G179R	C226D	V233W	Q275V	R289A	T349Y
13	10X	A47F		C97E		N159V			D164R		G179R	C226D	V233W	Q275V	R289A	T349Y
14	12X	A47F		C97E		N159V		T163R	D164R	E168R	G179R	C226D	V233W	Q275V	R289A	T349Y
15	13X	A47F	C97V		T136H	N159V	N159E	T163R	D164R	E168R	G179R	C226D	V233W	Q275V	R289A	T349Y
16	10X	A47F		C97E	T136H	N159V		T163R			G179R	C226D	V233W	Q275V		T349Y
17	12X	A47F		C97E	T136H	N159V		T163R	D164R	E168R	G179R	C226D	V233W	Q275V		T349Y
18	11X	A47F			T136H	N159V	N159E	T163R	D164R	E168R	G179R	C226D	V233W	Q275V		T349Y
19**	9X	A47F			T136H	N159V			D164R		G179R	C226D	V233W	Q275V	R289A	T349Y
20**	10X	A47F	C97V		T136H	N159V			D164R		G179R	C226D	V233W	Q275V		T349Y
21**	9X	A47F	C97V		T136H	N159V			D164R		G179R		V233W	Q275V		T349Y
22	6X	A47F			T136H	N159V						C226D	V233W			T349Y

* Possui um (L363P) adicional não introduzido através do desenvolvimento por GSSMTM. Esta mutação foi introduzida aleatoriamente e pode ou não ter qualquer relevância para a estabilidade térmica.

** Possuem uma marcação de Histidina C-terminal adicoinal (RSHHHHHH)

FIG. 10

Alteração por GSSM™	Aminoácido Original	Aminoácido Modificado Para	Localização da Mutação no Códon	Posições de Nucleotídeos do Códon Alterado na SEQ ID NO: 1	Códon Original	Códon Modificado Para	Todos os Códon Possíveis Para o Aminoácido Que Sofreu Mutação
A47F	A	F	47	139-141	GCC	TTT	TTT, TTC
C97V	C	V	97	289-291	TGT	GTT	GTT, GTC, GTA, GTG
C97E	C	E	97	289-291	TGT	GAG	GAA, GAG
T136H	T	H	136	406-408	ACC	CAT	CAT, CAC
N159V	N	V	159	475-477	AAC	GTC or GTG	GTT, GTC, GTA, GTG
N159E	N	E	159	475-477	AAC	GAG	GAA, GAG
T163R	T	R	163	487-489	ACT	CGG	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
D164R	D	R	164	490-492	GAC	CGG	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
E168R	E	R	168	502-504	GAG	CGG	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
G179R	G	R	179	535-537	GGG	CGG	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
C226D	C	D	226	676-678	TGT	GAT	GAT, GAC
V233W	V	W	233	697-699	GTA	TGG	TGG
Q275V	Q	V	275	823-825	CAA	GTG	GTT, GTC, GTA, GTG
R289A	R	A	289	865-867	CGC	GCT	GCT, GCC, GCA, GCG
T349Y	T	Y	349	1045-1047	ACG	TAT	TAT, TAC
L363P	L	P	363	1087-1089	CTA	CCA	CCA, CCC, CCG, CCT

FIG. 11

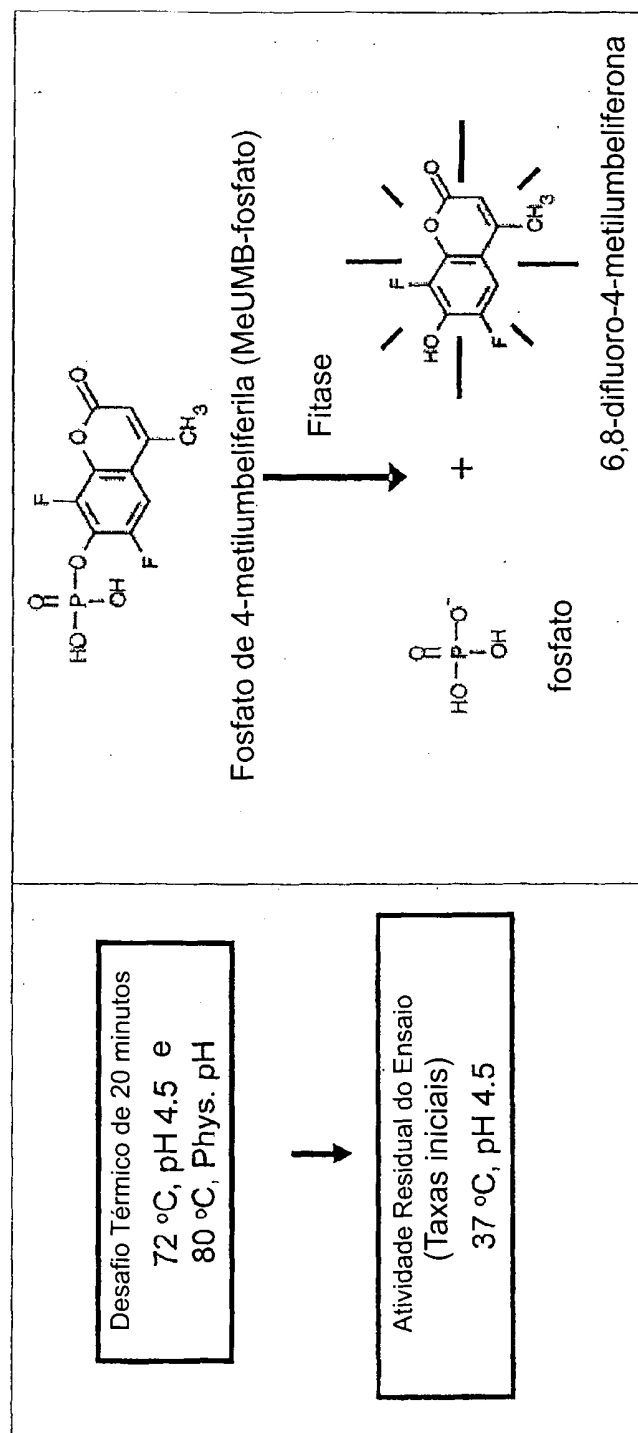


FIG. 12

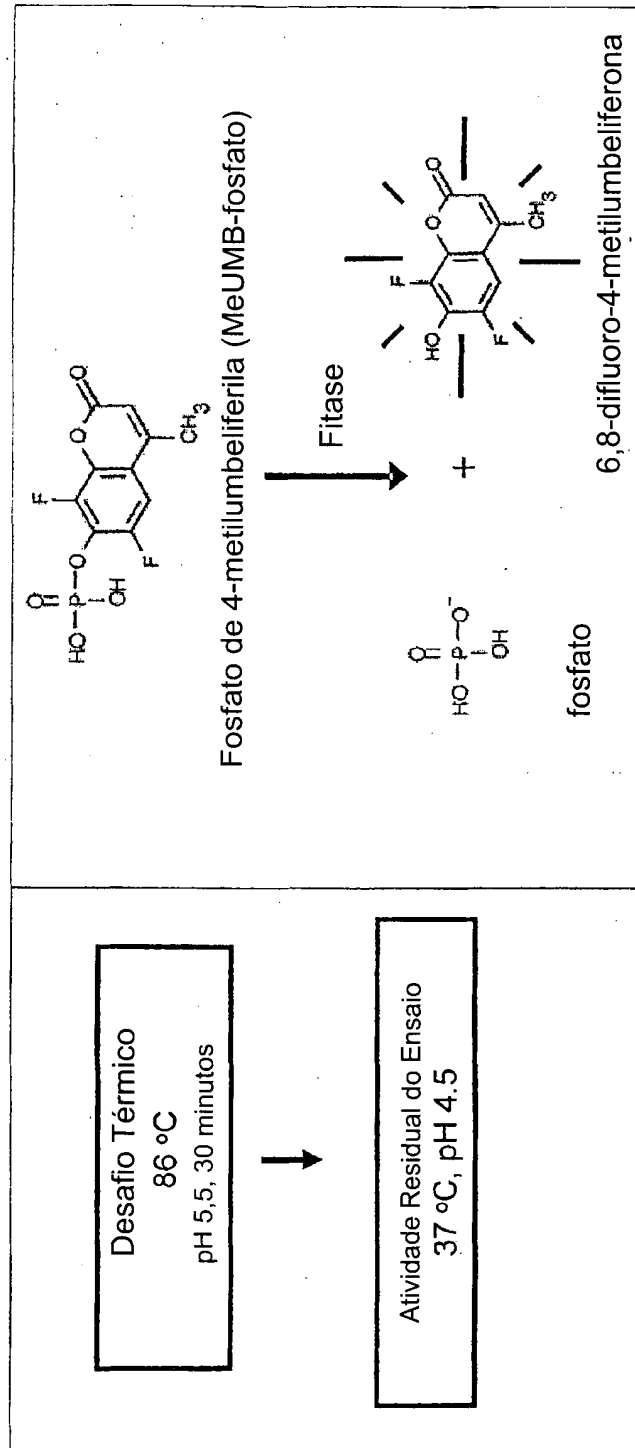
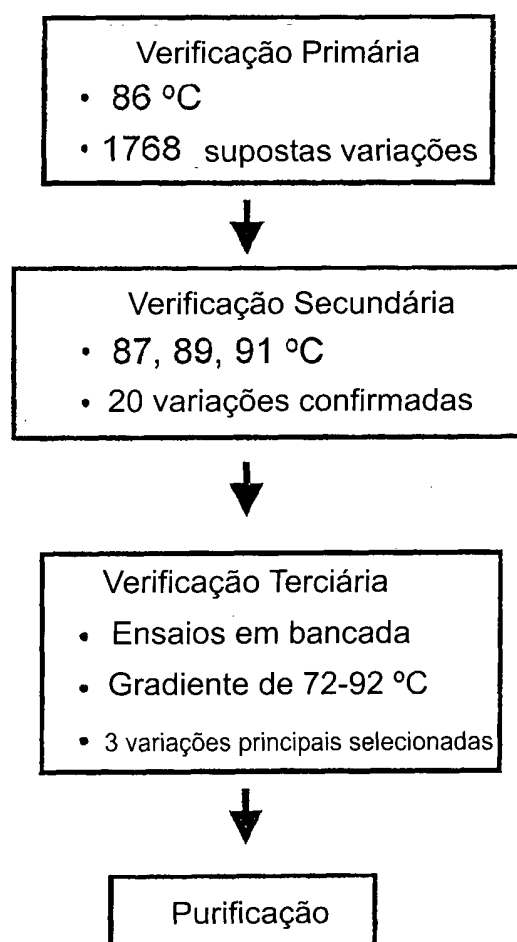


FIG. 13



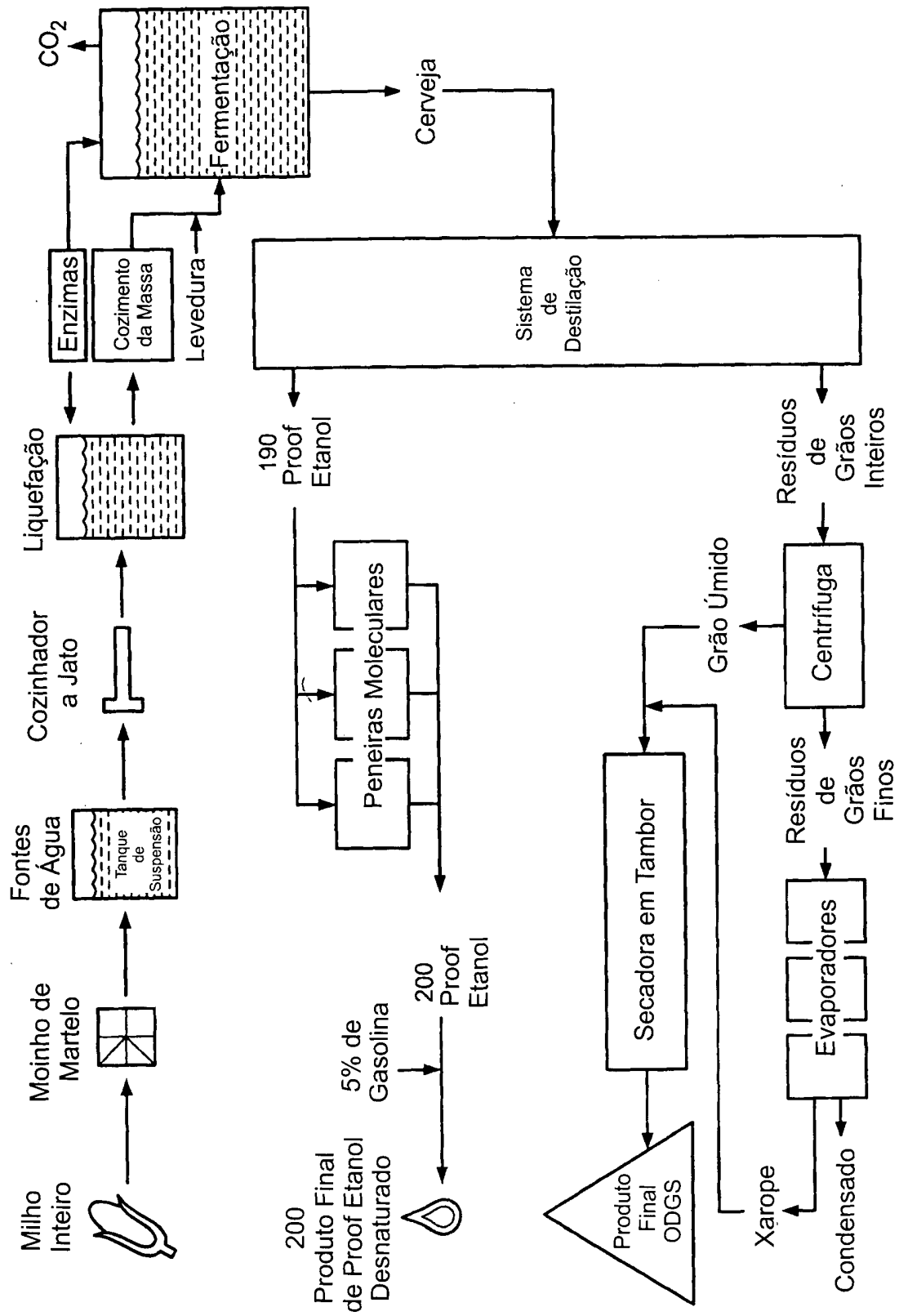


FIG. 14