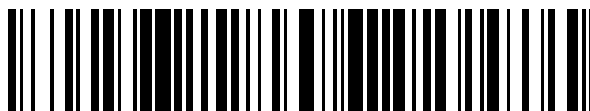


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 737 885**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/16** (2006.01)

**C12N 15/82** (2006.01)

**C12N 15/55** (2006.01)

**A01H 5/00** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2011 PCT/EP2011/054652**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2011 WO11117406**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2011 E 11709972 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 2553091**

54 Título: **Variantes termoestables de fitasa**

30 Prioridad:

**26.03.2010 EP 10158031**

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

**16.01.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**DE MARIA, LEONARDO;  
SKOV, LARS KOBBEROEE y  
SKJOET, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 737 885 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Variantes termoestables de fitasa

## 5 Campo de la invención

[0001] La presente divulgación se refiere a un método para producir una variante de fitasa que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID n.º 2 y que comprende establecer al menos un puente disulfuro en comparación con la SEQ ID n.º 2, en donde dicho(s) puente(s) disulfuro no se encuentran entre los cuatro que ocurren de manera natural en las posiciones 77/108, 133/408, 178/188 y 382/391 con la numeración que se proporciona en la SEQ ID n.º 2 y las fitasas estrechamente relacionadas (es decir, es una variante de las mismas). La divulgación también se refiere al ADN que codifica estas fitasas, a los métodos para su producción, así como a su uso, por ejemplo, en piensos y en aditivos para piensos. La parte madura de la referencia de fitasa de *Escherichia coli* se incluye en la lista de secuencias como la SEQ ID n.º 2. La fitasa de referencia es la depositada en UNIPROT bajo el id. A7ZK83.

Antecedentes de la invención

20 Antecedentes de la técnica

[0002] Las fitasas son enzimas bien conocidas, como lo son las ventajas de agregarlas a los piensos para animales, incluyendo humanos. Las fitasas se han aislado de diversas fuentes, incluidas varias cepas de hongos y bacterias.

[0003] Es un objeto de la presente invención proporcionar polipéptidos alternativos que tienen actividad de fitasa (fitasas) y polinucleótidos que codifican los polipéptidos. Las variantes de fitasa de la divulgación exhiben propiedades modificadas o alteradas, preferiblemente mejoradas, en comparación con la fitasa original. Ejemplos no limitantes de tales propiedades son: Estabilidad (por ejemplo, estabilidad frente a los ácidos, estabilidad térmica, estabilidad frente al vapor, estabilidad frente a la granulación y/o estabilidad de proteasas, en particular estabilidad de pepsina), perfil de temperatura, perfil de pH, actividad específica, especificidad de sustrato, rendimiento en el pienso para animales (por ejemplo, una liberación y/o degradación mejoradas del fitato), susceptibilidad a la glicación y/o patrón de glicosilación.

[0004] Tal como se describe en este documento, la mutagénesis de un polinucleótido progenitor que codifica una fitasa se emplea para preparar variantes de ADN (sintéticas) que codifican una fitasa que tiene propiedades mejoradas con respecto a la fitasa codificada por el polinucleótido progenitor.

[0005] Se conocen varias estructuras tridimensionales de fitasas del tipo fosfato ácido de histidina (HAP). (p. ej., Lim et al. *Nature struct. biol.* 7, 108-113 (2000)). De estos se ha encontrado que todos ellos tienen cuatro puentes disulfuro ubicados en los pares de posición 77/108, 133/407, 178/187, 381/390 (según la numeración utilizada aquí). Típicamente estos ocupan todas las cisteínas presentes en la molécula.

Escherichia

[0006] La secuencia del gen *appA* de *E. coli* fue publicada en 1990 por Dassa et al. (*J. Bact.* P5497-5500, 1990). La fitasa de *E. coli* comprende los cuatro puentes disulfuro indicados anteriormente y no hay otras cisteínas presentes.

[0007] Las variantes de la fitasa de *E. coli* se describieron por primera vez en Ostanin et al. 1992 (*J. Biol. Chem.* 267 (32) 15 de noviembre, págs. 22830-22836, 1992) [R16A, H17N, R20A, R92A, H303A, R63A] que muestran que el reemplazo del R16 y H17 fue perjudicial para la actividad y también que el reemplazo del R20, R92 y H303 redujo la actividad muy fuertemente, mientras que el reemplazo del R63 proporcionó un efecto positivo pequeño en la actividad.

[0008] Otras variantes de la fitasa de *E. coli* se han descrito en WO 2006/028684 (Diversa Corp.), WO 2009/073399 (Syngenta Part. AG), WO 2008/036916 (Verenium Inc.), WO 02/095003 (Diversa Corp.),

[0009] Es un objeto de la divulgación proporcionar fitasas con propiedades de temperatura modificadas, preferiblemente mejoradas. Ejemplos no limitantes de tales propiedades son: termoestabilidad y perfil de temperatura.

Breve descripción de los dibujos y listado de secuencias.

[0010] La fig. 1 es una alineación de las fitasas de las SEQ ID n.º 2 a 6. Los números de posición en la fig. 1 se refieren a la numeración de la SEQ ID n.º 2.

[0011] En la Figura (lista de secuencias) las secuencias se aplican de la siguiente manera:

SEQ ID n.º 1	ADN que codifica la SEQ ID n.º 2
SEQ ID n.º 2	E. coli fitasa tipo salvaje
SEQ ID n.º 3	Tipo salvaje de WO 2009/073399
SEQ ID n.º 4	Variante Nov9X de WO 2009/073399
SEQ ID n.º 5	SEQ ID n.º 2 de WO 2008/036916 (18 y 323 son Xaa)
SEQ ID n.º 6	SEQ ID n.º 4 de WO 2008/036916

5 Resumen de los ejemplos

[0012] En la especificación se proporcionan los siguientes ejemplos:

- 10 Ejemplo 1: Preparación de variantes, y determinación de actividad.  
 Ejemplo 2: Actividad específica  
 Ejemplo 3: Termoestabilidad  
 Ejemplo 4: Perfil de temperatura.  
 Ejemplo 5: Perfil de pH.  
 Ejemplo 6: Rendimiento en piensos para animales en un modelo in vitro  
 15 Ejemplo 7: Rendimiento en un ensayo in vivo con cerdos

Descripción detallada de la invención

20 [0013] En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una variante de fitasa que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID n.º 2 y que comprende establecer al menos un puente disulfuro en comparación con la SEQ ID n.º 2, en donde dicho(s) puente(s) disulfuro no se encuentran entre los cuatro que ocurren de manera natural en las posiciones 77/108, 133/408, 178/188 y 382/391 con la numeración que se proporciona en la SEQ ID n.º 2, donde al menos un puente disulfuro es el par de posiciones: A) 52C/99C, y en donde la variante de fitasa es más termoestable que la fitasa de referencia.

25 [0014] El porcentaje de identidad se determina como se describe en la SEQción "Polipéptidos de fitasa, porcentaje de identidad".

30 [0015] Los números de posición se refieren a la numeración de posición de la SEQ ID n.º 2, como se describe en la SEQción "Numeración de posición". Las posiciones correspondientes a estos números de posición de la SEQ ID n.º 2 en otras fitasas se determinan como se describe en la SEQción "Identificación de los números de posición correspondientes".

35 [0016] El (al menos un) puente disulfuro es el par de posición: A) 52C/99C ..

[0017] De acuerdo con la invención, un primer puente disulfuro se establece preferiblemente en el par de posiciones A entre los residuos en las posiciones 52 y 99, y un segundo puente disulfuro se establece en el par de posiciones B entre los residuos en las posiciones 141 y 200.

40 [0018] En ciertas realizaciones, el número de puentes disulfuro establecidos es 2, 3, 4, 5, 6 y/o 7.

[0019] Cuando el número de puentes disulfuro establecidos es dos, se pueden crear las siguientes combinaciones de pares de posiciones: A + B, A + C, A + D, A + E, A + F y A + G.

45 [0020] Cuando el número de puentes disulfuro establecidos es tres, se pueden crear las siguientes combinaciones de pares de posiciones:  
 A + B + C, A + B + D, A + B + E, A + B + F, A + B + G, A + C + D, A + C + E, A + C + F, A + C + G, A + D + E, A + D + F, A + D + G, A + E + F, A + E + G y A + F + G.

50 [0021] Cuando el número de puentes disulfuro establecidos es cuatro, se pueden crear las siguientes combinaciones de pares de posiciones: A + B + C + D, A + B + C + E, A + B + C + F, A + B + C + G, A + B + D + E, A + B + D + F, A + B + D + G, A + B + E + F, A + B + E + G, A + B + F + G, A + C + D + E, A + C + D + F, A + C + D + G, A + C + E + F, A + C + E + G, A + C + E + H, A + C + F + G, A + D + E + F, A + D + E + G, A + D + F + G y A + E + F + G.

55 [0022] Cuando el número de puentes disulfuro establecidos es cinco, se pueden crear las siguientes

combinaciones de pares de posiciones: 'A + B + C + D + E, A + B + C + D + F, A + B + C + D + G, A + B + C + E + F, A + B + C + E + G, A + B + C + F + G, A + B + D + E + F, A + B + D + E + G, A + B + D + F + G, A + B + E + F + G, A + B + F + G + H, A + C + D + E + F, A + C + D + E + G, A + C + D + F + G, A + C + E + F + G, y A + D + E + F + G. Cuando el número de puentes disulfuro establecidos es seis, se pueden crear las siguientes combinaciones de pares de posiciones: A + B + C + D + E + F, A + B + C + D + E + G, A + B + C + D + F + G, A + B + C + E + F + G, A + B + D + E + F + G y A + C + D + E + F + G. Cuando el número de puentes disulfuro establecidos es siete, se puede crear la siguiente combinación de pares de posiciones: A + B + C + D + E + F + G.

[0023] En todas las combinaciones anteriores, A significa 52C/99C, B significa 141C/200C, C significa 31C/177C, D significa 91C/46C, E significa 31C/176C, F significa 59C/100C y G significa 162C/248C.

[0024] Según la invención, la variante de fitasa puede comprender además al menos una modificación en al menos una posición seleccionada de las siguientes: 25, 37, 38, 75, 77, 108, 114, 123, 126, 127, 133, 137, 141, 142, 146, 157, 173, 178, 188, 204, 211, 233, 235, 253, 267, 286, 287, 317, 318, 327, 367, 382, 391 y 408.

[0025] La invención proporciona además que las modificaciones anteriores se eligen específicamente entre las siguientes modificaciones: 25F, 37F, 38Y, 75K, 75V, 75E, 77A, 108A, 114H, 123E, 126Y, 127L, 127V, 133A, 137E, 137V, 141R, 142R, 146R, 157R, 173Y, 178A, 188A, 204N, 204D, 211W, 233E, 235Y, 253V, 267A, 286F, 287Y, 317L, 318Y, 327Y, 367F, 382A, 391A, y 408A.

[0026] De acuerdo con la invención, los puentes disulfuro adicionales son G52C/A99C. En otras realizaciones específicas de la invención, se seleccionan modificaciones específicas adicionales de: A25F, W37F, P38Y, C75K, C75V, C75E, C77A, C108A, T114H, P123E, N126Y, P127L, P127V, C133A, N137E, N137V, T141R, D142R, E146R, G157R, P173Y, C178A, C188A, C204N, C204D, V211W, G233E, G235Y, Q253V, R267A, K286F, Q287Y, N317L, W318Y, T327Y, S367F, C382A, C391A, C408A, y/o de las siguientes combinaciones W37F/P38Y, P123E/P127L, N126Y/P127V, G233E/G235Y, K286F/Q287Y, N317L/W318Y, W37F/P38Y/P123E/P127L, W37F/P38Y/N126Y/P127V, P173Y/N317L/W318Y, C75K/C204N/C178A/C188A, C75K/C204N/C382A/C391A, C75K/C204N/C178A/C188A/C382A/C391A, C75K/C204N/C77A/C108A, C75K/C204N/C133A/C108AA25F/C75V/T114H/N137E/T141R/E146R/G157R/C204D/V211W/Q253V/R267A/T327Y

C178A/C188AA25F/C75V/T114H/N137E/T141R/E146R/G157R/C204D/V211W/Q253V/R267A/T327Y/C382A/C391AA25F/C75V/T114H/N137E/T141R/E146R/G157R/C204D/V211W/Q253V/R267A/T327Y/C178A/C188A/C382A/C391A A25F/C75V/T114H/N137E/T141R/E146R/G157R/C204D/V211W/Q253V/R267A/T327Y/C77A/C108AA25F/C75V/T114H/N137E/T141R/E146R/G157R/C204D/V211W/Q253V/R267A/T327Y/C133A/C408AA25F/C75E/T114H/N137V/G157R/C204D/V211W/Q253V/R267A/T327YA25F/C75E/N137V/T141R/D142R/G157R/C204D/V211W/Q253V/T327YA25F/T114H/N137V/T141R/D142R/E146R/G157R/C204DA/211W/Q253V/R267A/T327YA25F/C75V/T114H/N137V/T141R/E146R/G157R/C204DA/211W/Q253V/R267A/T327YA25F/C75V/T114H/N137V/T141R/D142R/E146R/G157R/C204D/V211W/Q253V/T327YA25F/C75E/T114H/N137V/T141R/D142R/E146R/G157R/C204D/V211W/Q253V/T327YA25F/C75E/T114H/N137V/T141R/D142R/E146R/G157R/C204D/V211W/Q253V/T327YA25F/C75E/T114H/N137V/T141R/D142R/E146R/G157R/C204D/V211W/Q253V/R267A/T327YA25F/C75E/T114H/N137V/T141R/D142R/E146R/G157R/V211W/Q253V/R267A/T327Y/L341PA47F/C97V/T136H/N159V/T163R/D164R/G179R/V233W/Q275V/R289A/T349YA25F/C75E/T114H/N137V/T141R/D142R/E146R/G157R/C204D/V211W/Q253V/R267A/T327YA25F/C75E/N137V/D142R/G157R/C204D/V211W/Q253V/R267A/T327Y A25F/C75E/N137E/T141R/D142R/E146R/G157R/C204D/V211W/Q253V/R267A/T327YA25F/C75V/T114H/N137E/T141R/D142R/E146R/G157R/C204D/V211W/Q253V/R267A/T327YA25F/C75E/T114H/N137V/T141R/G157R/C204D/V211W/Q253V/T327YA25F/C75E/T114H/N137V/T141R/D142R/E146R/G157R/C204D/V211W/Q253V/T327YA25F/T114H/N137E/T141R/D142R/G157R/C204D/V211W/Q253V/R267A/T327YA25F/T114H/N137V/D142R/G157R/C204D/V211W/Q253V/T327YA25F/C75V/T114H/N137V/D142R/G157R/V211W/Q253V/T327Y A25F/T114H/N137V/C204D/V211W/T327Y

[0027] En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para preparar la variante de fitasa de la invención, que comprende establecer al menos un puente disulfuro en comparación con la SEQ ID n.º 2, en el que dicho puente disulfuro no está entre los cuatro de origen natural en las posiciones 77/108, 133/408, 178/188 y 382/391 con la numeración que se proporciona en la SEQ ID n.º 2, y en la que dicho(s) puente(s) disulfuro se establece(n) en el par de posiciones: A) 52C/99C.

[0028] El método de la invención se puede usar para crear una variante de cualquier fitasa de tipo salvaje o variante de fitasa. En realizaciones particulares, produce una variante de la parte madura de la fitasa de la SEQ ID n.º 2, la SEQ ID n.º 3, la SEQ ID n.º 4, la SEQ ID n.º 5 o la SEQ ID n.º 6 se usa como progenitor/esqueleto para producir la variante de fitasa.

5 [0029] El método de la invención proporciona una fitasa en la que la variante de fitasa es más termoestable que la fitasa de referencia. El método de la divulgación puede proporcionar una variante de fitasa que tiene propiedades mejoradas adicionales, tales como estabilidad térmica, estabilidad frente al vapor, perfil de temperatura, estabilidad al sedimentar, estabilidad frente al ácido, perfil del pH y/o estabilidad de proteasa, en particular estabilidad de pepsina, actividad específica, especificidad del sustrato, rendimiento en el pienso para animales (por ejemplo, una liberación y/o degradación mejoradas del fitato), susceptibilidad a la glicosilación y/o patrón de glicosilación. Las variantes proporcionadas por la invención exhiben propiedades térmicas especialmente mejoradas, tales como la termoestabilidad, la estabilidad frente al calor, la estabilidad frente al vapor, el perfil de temperatura, la estabilidad de granulación o el rendimiento mejorado en el pienso para animales.

15 [0030] El método de la invención se relaciona así con variantes de fitasa que tienen propiedades térmicas mejoradas, tales como termoestabilidad, estabilidad frente al calor, estabilidad frente al vapor, perfil de temperatura y/o estabilidad de granulación.

[0031] El método de la invención se refiere así a variantes de fitasa que tienen termoestabilidad mejorada.

20 [0032] El método de la divulgación se refiere así a variantes de fitasa que tienen estabilidad frente al calor mejorada.

[0033] El método de la divulgación se refiere así a variantes de fitasa que tienen estabilidad frente al vapor mejorada.

25 [0034] El método de la divulgación se refiere así a variantes de fitasa que tienen un perfil de temperatura mejorado.

30 [0035] El método de la divulgación se refiere así a variantes de fitasa que tienen estabilidad de granulación mejorada.

[0036] El método de la divulgación se refiere así a variantes de fitasa que tienen estabilidad frente al ácido mejorada.

35 [0037] El método de la divulgación se refiere así a variantes de fitasa que tienen un perfil de pH mejorado.

[0038] El método de la divulgación se refiere así a variantes de fitasa que tienen estabilidad de proteasa mejorada, en particular estabilidad de pepsina.

40 [0039] El método de la divulgación se refiere así a variantes de fitasa que tienen una actividad específica mejorada.

[0040] El método de la divulgación se refiere así a variantes de fitasa que tienen una especificidad de sustrato mejorada.

45 [0041] El método de la divulgación se refiere así a variantes de fitasa que tienen un rendimiento mejorado en el pienso para animales (por ejemplo, una liberación y/o degradación mejoradas del fitato).

50 [0042] El método de la divulgación se refiere así a variantes de fitasa que tienen una susceptibilidad mejorada a la glicosilación.

[0043] El método de la divulgación se refiere así a variantes de fitasa que tienen un patrón de glicosilación mejorado.

55 [0044] La invención se refiere además a polinucleótidos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican las variantes de fitasa de la invención, constructos de ácidos nucleicos que comprenden los polinucleótidos operativamente enlazados a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un huésped de expresión, vectores de expresión recombinantes que comprenden dichos constructos de ácidos nucleicos y células huésped recombinantes que comprenden un constructo de ácidos nucleicos y/o un vector de expresión.

60 [0045] La invención se refiere además a métodos para producir variantes de fitasa tal como se proporciona que comprenden

- 65 (a) cultivar una célula huésped para producir un sobrenadante que comprende la fitasa; y  
 (b) recuperar la fitasa.

[0046] La descripción se refiere además a plantas transgénicas, o partes de la planta, capaces de expresar las variantes de fitasa.

[0047] La invención se refiere además a composiciones que comprenden al menos una variante de fitasa de la invención, y (a) al menos una vitamina liposoluble; (b) al menos una vitamina hidrosoluble; y/o (c) al menos un oligoelemento. Dichas composiciones pueden comprender además al menos una enzima seleccionada del siguiente grupo de enzimas: amilasa, fitasa, fosfatasa, xilanas, galactanas, alfa-galactosidasa, proteasa, fosfolipasa y/o beta-glucanasa. Las composiciones pueden ser aditivos para piensos de animales que pueden tener un contenido de proteína bruta de 50 a 800 g/kg y que comprenden una variante de fitasa de la invención.

[0048] La invención se refiere además a métodos para mejorar el valor nutricional de un pienso para animales, mediante la adición de una variante de fitasa de la invención al pienso, procesos para reducir los niveles de fitato en el estiércol animal alimentando a un animal con una cantidad efectiva del pienso, métodos para el tratamiento de proteínas vegetales, que comprenden la etapa de añadir una variante de fitasa a al menos una proteína vegetal, y el uso de una variante de fitasa de una composición de la invención.

[0049] La invención también proporciona un método para generar un producto de fermentación tal como, por ejemplo, etanol, cerveza o vino, que comprende fermentar un material de carbohidratos en presencia de una variante de fitasa, un método para producir etanol que comprende fermentar un material de carbohidratos en presencia de una variante de fitasa y producir etanol.

Polipéptidos de fitasa, porcentaje de identidad

[0050] En el presente contexto, una fitasa es un polipéptido que tiene actividad de fitasa, es decir, una enzima que cataliza la hidrólisis de fitato (mio-inositol hexakisfosfato) a (1) mio-inositol y/o (2) mono, di, tri, tetra y/o penta-fosfatos del mismo y (3) fosfato inorgánico.

[0051] En el presente contexto, el término "un sustrato de fitasa abarca", por ejemplo, ácido fítico y cualquier fitato (sal de ácido fítico), así como los fosfatos enumerados en (2) anteriormente.

[0052] El sitio ENZYME en internet (<http://www.expasy.ch/enzyme/>) es un repositorio de información relativa a la nomenclatura de enzimas. Se basa principalmente en las recomendaciones del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUB-MB) y describe cada tipo de enzima caracterizada para la cual se ha proporcionado un número de EC (Comisión de Enzimas) (Bairoch A. The ENZYME database, 2000, Nucleic Acids Res 28: 304-305). (Ver también el manual de nomenclatura enzimática de NC-IUBMB, 1992).

[0053] Según el sitio ENZYME, se conocen tres tipos diferentes de fitasas: la llamada 3-fitasa (nombre alternativo de 1-fitasa; un mio-inositol hexafosfato 3-fosfohidrolasa, EC 3.1.3.8), la llamada 4-fitasa (nombre alternativo de la 6-fitasa, nombre basado en el sistema de numeración 1L y no de la numeración 1D, EC 3.1.3.26), y la llamada 5-fitasa (EC 3.1.3.72). Para los propósitos de la presente invención, los tres tipos están incluidos en la definición de fitasa.

[0054] En una realización particular, las fitasas de la invención pertenecen a la familia de fosfatasas ácidas de histidina, que incluye la fosfatasa ácida de pH 2.5 de Escherichia coli (gen appA), así como las fitasas fúngicas como las fitasas A y B de Aspergillus awamorii (EC: 3,1. 3.8) (gen phyA y phyB). Las fosfatasas ácidas de histidina comparten dos regiones de similitud de secuencia, cada una centrada alrededor de un residuo de histidina conservado. Estas dos histidinas parecen estar involucradas en el mecanismo catalítico de las enzimas. La primera histidina se ubica en la SEQción N-terminal y forma un intermedio de histidina de fósforo, mientras que la segunda se ubica en la SEQción C-terminal y posiblemente actúa como donante de protones.

[0055] En una realización particular adicional, las fitasas de la invención tienen una fracción de sitio activo conservado, a saber, R-H-G-X-R-X-P, en donde X designa cualquier aminoácido (véanse los aminoácidos 16 a 22 de las SEQ ID n.º 2, 3, 4, 6 y los aminoácidos 38-44 de la SEQ ID n.º 9). En una realización preferida, la fracción del sitio activo conservada es R-H-G-V-R-A-P, es decir, los aminoácidos 16-22 (por referencia a la SEQ ID n.º 2) son RHGVRAP.

[0056] Para los propósitos de la presente invención, la actividad de la fitasa se determina en la unidad de FYT, siendo un FYT la cantidad de enzima que libera 1 micromol de ortofosfato inorgánico por minuto bajo las siguientes condiciones: pH 5.5; temperatura 37 °C; sustrato: fitato de sodio (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>24</sub>P<sub>6</sub>Na<sub>12</sub>) en una concentración de 0.0050 mol/l. Los ensayos de fitasa adecuados son los ensayos FYT y FTU descritos en el Ejemplo 1 de WO 00/20569. FTU es para determinar la actividad de la fitasa en el pienso y la premezcla. La actividad de la fitasa también se puede determinar utilizando los ensayos del Ejemplo 1 ("Determinación de la actividad de la fosfatasa" o "Determinación de la actividad de fitasa").

[0057] En una realización particular, la fitasa de la invención está aislada. El término "aislado" como se usa en el

presente documento se refiere a un polipéptido que es al menos un 20 % puro, preferiblemente al menos un 40 % puro, más preferiblemente al menos un 60 % puro, incluso más preferiblemente al menos un 80 % puro, lo más preferiblemente al menos un 90 % puro y aún más preferiblemente al menos 95 % puro, según lo determinado por SDS-PAGE. En particular, se prefiere que los polipéptidos estén en "forma esencialmente pura", es decir, que la preparación de polipéptidos esté esencialmente libre de otro material polipeptídico con el que esté asociado de forma nativa. Esto se puede lograr, por ejemplo, preparando el polipéptido por medio de métodos recombinantes bien conocidos o por métodos de purificación clásicos.

[0058] La relación entre dos secuencias de aminoácidos se describe mediante el parámetro "identidad". Para los fines de la presente invención, la alineación de dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando el programa Needle del paquete EMBOSS (<http://emboss.org>) versión 2.8.0. El programa Needle implementa el algoritmo de alineación global descrito en Needleman, S. B. y Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453. La matriz de sustitución utilizada es BLOSUM62, la penalización por abertura de gap es 10 y la penalización por extensión de gap es 0.5.

[0059] El grado de identidad entre una secuencia de aminoácidos de la presente invención ("secuencia de la invención") y la secuencia de aminoácidos mencionada en las reivindicaciones (SEQ ID n.º 2) se calcula como el número de coincidencias exactas en una alineación de las dos secuencias, divididas por la longitud de la "secuencia de la invención" o la longitud de la SEQ ID n.º 2, la que sea la más corta. El resultado se expresa en porcentaje de identidad.

[0060] Se produce una coincidencia exacta cuando la "secuencia de la invención" y la SEQ ID n.º 2 tienen residuos de aminoácidos idénticos en las mismas posiciones del solapamiento (en el ejemplo de alineación a continuación se representa con "|"). La longitud de una secuencia es el número de residuos de aminoácidos en la secuencia (por ejemplo, la longitud de los aminoácidos 1-411 de la SEQ ID n.º 2 es 411).

[0061] En el siguiente ejemplo de alineación puramente hipotético, el solapamiento es la secuencia de aminoácidos "HTWGER-NL" de la secuencia 1; o la secuencia de aminoácidos "HGWGEDANL" de la secuencia 2. En el ejemplo, un gap se indica con un "-".

[0062] Ejemplo de alineación hipotética:

```

secuencia 1:      ACMSHTWGER-NL
                   |  | | |  | |
secuencia 2:      HGWGEDANLAMNPS
    
```

[0063] En una realización particular, el porcentaje de identidad de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido con la SEQ ID n.º 2 se determina i) alineando las dos secuencias de aminoácidos usando el programa Needle, con la matriz de sustitución BLOSUM62, una penalización de apertura de gap de 10, y una penalización de extensión de hueco de 0.5; ii) contando el número de coincidencias exactas en la alineación; iii) dividiendo el número de coincidencias exactas por la longitud de la más corta de las dos secuencias de aminoácidos, y iv) convirtiendo el resultado de la división de iii) en porcentaje.

[0064] En el ejemplo hipotético anterior, el número de coincidencias exactas es 6, la longitud de la más corta de las dos secuencias de aminoácidos es 12; en consecuencia, el porcentaje de identidad es del 50 %.

[0065] En aspectos particulares de la fitasa de la invención, el grado de identidad con la SEQ ID n.º 2, la SEQ ID n.º 4 y/o la SEQ ID n.º 6 es al menos de un 70 %, un 71 %, un 72 %, un 73 %, un 74 %, un 75 %, un 76 %, un 77 %, un 78 %, un 79 %, un 80 %, un 81 %, un 82 %, un 83 %, un 84 %, un 85 %, un 86 %, un 87 %, un 88 %, un 89 %, un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o al menos de un 99 %. En otras realizaciones particulares, el grado de identidad es al menos de un 98.0 %, un 98.2 %, un 98.4 %, un 98.6 %, un 98.8 %, un 99.0 %, un 99.1 %, un 99.2 %, un 99.3 %, un 99.4 %, un 99.5 %, un 99.6 %, un 99.7 %, un 99.8 % o al menos de un 99.9 %. En realizaciones alternativas, el grado de identidad es al menos de un 70 %, un 71 %, un 72 % o al menos de un 73 %.

[0066] En otros aspectos particulares adicionales, la fitasa de la invención no tiene más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o no más de 10 modificaciones en comparación con la SEQ ID n.º 2, la SEQ ID n.º 4 y/o la SEQ ID n.º 6 o cualquier otra fitasa progenitora; no más de 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o no más de 20 modificaciones en comparación con la SEQ ID n.º 2; no más de 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o no más de 30 modificaciones en comparación con la SEQ ID n.º 2; no más de 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o no más de 40 modificaciones en comparación con la SEQ ID n.º 2, la SEQ ID n.º 4 y/o la SEQ ID n.º 6 o cualquier otra fitasa progenitora; no más de 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o no más de 50 modificaciones en comparación con la SEQ ID n.º 2, la SEQ ID n.º 4 y/o la SEQ ID n.º 6 o cualquier otra fitasa progenitora; no más de 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 o no





posición D en la SEQ ID n.º 2 se encuentra alineando las dos secuencias como se especificó anteriormente en la SEQción titulada "Polipéptidos de fitasa, porcentaje de identidad". A partir de la alineación, la posición en la secuencia de la invención correspondiente a la posición D de la SEQ ID n.º 2 puede identificarse de manera clara y sin ambigüedades (las dos posiciones una encima de la otra en la alineación).

5 [0079] A continuación, se incluyen algunos ejemplos adicionales, puramente hipotéticos, que se derivan de la tabla 1 anterior, que en la tercera columna incluye una serie de alineaciones de dos secuencias: Considere la tercera celda en la primera fila de la tabla 1: La secuencia superior es la plantilla, la inferior es la variante. La posición número 80 se refiere al residuo de aminoácido G en la plantilla. El aminoácido A ocupa la posición correspondiente en la variante. En consecuencia, esta sustitución se designa G80A.

15 [0080] Considere ahora la tercera celda en la segunda fila de la tabla 1: La secuencia superior es nuevamente la plantilla y la inferior es la variante. La posición número 80 nuevamente se refiere al residuo de aminoácido G en la plantilla. La variante tiene dos inserciones, a saber, TY, después de G80 y antes de V81 en la plantilla. Mientras que la T y la Y, por supuesto, tendrían su propio número de posición "real" en la variante de secuencia de aminoácidos, para los propósitos actuales siempre nos referimos a los números de posición de la plantilla y, en consecuencia, se dice que la T y la Y están en el número de posición 80a y 80b, respectivamente.

20 [0081] Finalmente, considere la tercera celda en la última fila de la tabla 1: El número de posición 275 se refiere al último aminoácido de la plantilla. Se dice que una extensión C-terminal de ST está en las posiciones número 275a y 275b, respectivamente, aunque, nuevamente, por supuesto, tienen su propio número de posición "real" en la secuencia de aminoácidos variante.

Propiedades modificadas, fitasa de referencia

25 [0082] En un aspecto particular, la fitasa de la divulgación tiene propiedades modificadas, preferiblemente mejoradas. Los términos "modificado" y "mejorado" implican una comparación con otra fitasa. Ejemplos de otras fitasas, de referencia o de comparación, son: SEQ ID n.º 3, la SEQ ID n.º 4, la SEQ ID n.º 5 y/o la SEQ ID n.º 6.

30 [0083] Ejemplos no limitantes de propiedades que se modifican, preferiblemente se mejoran, son los siguientes: termoestabilidad, perfil de pH, actividad específica, rendimiento en el pienso para animales, sensibilidad a la proteasa y/o patrón de glicosilación. La fitasa de la divulgación también puede tener un perfil de temperatura modificado, preferiblemente mejorado, y/o puede incorporar un cambio de un sitio potencial de escisión de proteasas.

35 Rendimiento térmico,

#### Termoestabilidad

40 [0084] La termoestabilidad se puede determinar como se describe en el ejemplo 3, es decir, usando mediciones de DSC para determinar la temperatura de desnaturalización, T<sub>d</sub>, de la proteína fitasa purificada. La T<sub>d</sub> es indicativa de la termoestabilidad de la proteína: cuanto más alta es la T<sub>d</sub>, mayor es la termoestabilidad. Por consiguiente, en una realización preferida, la fitasa de la invención tiene una T<sub>d</sub> que es mayor que la T<sub>d</sub> de una fitasa de referencia, en donde la T<sub>d</sub> se determina en muestras de fitasa purificadas (preferiblemente con una pureza de al menos un 90 % o un 95 %, determinada mediante SDS-PAGE).

50 [0085] La termoestabilidad también se puede determinar de la siguiente manera. Por consiguiente, en una realización preferida, la fitasa de la invención, después de la incubación durante 60 minutos a 70 °C y pH 4.0, tiene una actividad residual mejorada en comparación con la actividad residual de una fitasa de referencia tratada de la misma manera, siendo la actividad residual calculada para cada fitasa en relación con la actividad encontrada antes de la incubación (a los 0 minutos). La actividad residual se mide preferiblemente en fitato de sodio a pH 5.5 y 37 °C. La incubación se realiza preferiblemente en acetato de sodio 0.1 M, pH 4.0. La fitasa preferiblemente se purifica, más preferiblemente a una pureza de al menos un 95 %, determinada mediante SDS-PAGE. Un tampón de ensayo de actividad de fitasa preferido es el acetato de Na 0.25 M, pH 5.5. Usando este método, la actividad residual de la fitasa de la invención es preferiblemente al menos de un 105 % de la actividad residual de la fitasa de referencia, más preferiblemente al menos de un 110 %, 115 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 190 % o al menos de un 200 %. En la alternativa, la actividad residual relativa a la actividad a los 0 minutos es preferiblemente al menos de un 31 % o al menos de un 32 %. Se prefieren las siguientes sustituciones que proporcionan termoestabilidad mejorada (consulte la tabla 9): 273L, 46E, 362R y/o 53V.

60 [0086] En una realización particular, la variante de fitasa de la invención es más termoestable que la fitasa de referencia, en donde la termoestabilidad se determina usando cualquiera de las cuatro pruebas mencionadas anteriormente (basadas en los ejemplos).

65 Estabilidad frente al calor

[0087] La estabilidad frente al calor puede determinarse como se describe en el ejemplo 4, determinando el perfil de temperatura/actividad de las variantes de fitasa.

5 Perfil de temperatura/estabilidad de la temperatura.

[0088] Si una fitasa de la invención tiene o no un perfil de temperatura modificado en comparación con una fitasa de referencia puede determinarse como se describe en el ejemplo 4. Por consiguiente, en una realización particular, la fitasa de la invención tiene un perfil de temperatura modificado en comparación con una fitasa de referencia, en donde el perfil de temperatura se determina como actividad de fitasa en función de la temperatura en fitato de sodio a pH 5.5 en el rango de temperatura de 20-90 °C (en pasos de 10 °C). Un tampón preferido es el tampón de acetato de sodio 0.25 M, pH 5.5. La actividad a cada temperatura se indica preferiblemente como actividad relativa (en %) normalizada al valor a temperatura óptima. La temperatura óptima es aquella temperatura dentro de las temperaturas examinadas (es decir, aquellas con saltos de 5-10 °C) donde la actividad es más alta.

Perfil de pH

[0089] Si una fitasa de la divulgación tiene o no un perfil de pH modificado en comparación con una fitasa de referencia, se puede determinar como se describe en los ejemplos. Por consiguiente, en una realización particular, la fitasa de la invención tiene un perfil de pH modificado en comparación con una fitasa de referencia, en donde el perfil de pH se determina como actividad de fitasa en función del pH en fitato de sodio a 37 °C en el rango de pH de 2.0 a 7,5 (en pasos de 0.5 unidades de pH). Un tampón preferido es un cóctel de glicina 50 mM, ácido acético 50 mM y Bis-Tris 50 mM. Otro tampón preferido es acetato de sodio 0.25M. La actividad a cada pH se indica preferiblemente como actividad relativa (en %) normalizada al valor a pH óptimo.

[0090] Un ejemplo de un perfil de pH modificado es donde la curva de pH (actividad relativa en función del pH) se desplaza hacia un pH más alto o más bajo.

[0091] Otro ejemplo de un perfil de pH modificado es donde se modifica el pH óptimo, en dirección ascendente o descendente

[0092] También se puede determinar un perfil de pH modificado comparando la actividad de fosfatasa a pH 3.5 y 5.5. Alternativamente, la actividad a pH 3.5 puede compararse con la actividad a pH 4.0, 4.5 o 5.0. En otra realización alternativa adicional, se comparan las actividades de fitasa en lugar de las actividades de fosfatasa.

[0093] En una realización particular, la fitasa de la divulgación tiene un perfil de pH modificado en comparación con una fitasa de referencia. Más en particular, el perfil de pH se modifica en el rango de pH de 3.5-5.5. Aún más en particular, la actividad a pH 4.0, 4.5, 5.0 y/o 5.5 está en un nivel de al menos un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, o al menos un 95 % de la actividad a pH óptimo.

Actividad específica

[0094] En una divulgación particular, la fitasa de la invención tiene una actividad específica mejorada con respecto a una fitasa de referencia. Más en particular, la actividad específica de una fitasa de la divulgación es al menos del 105 %, en relación con la actividad específica de una fitasa de referencia determinada por el mismo procedimiento. En otros aspectos particulares, la actividad específica relativa es al menos de un 110, 115, 120, 125, 130, 140, 145, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 350 o incluso de un 400 %, aún en relación con la actividad específica de la fitasa de referencia según lo determinado por el mismo procedimiento.

[0095] En la alternativa, el término "alta actividad específica" se refiere a una actividad específica de al menos 200 FYT/mg de proteína enzimática (PE). En aspectos particulares, la actividad específica es al menos 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900 o 3000 FYT/mg PE.

[0096] La actividad específica se mide en muestras altamente purificadas (un gel de poliacrilamida con SDS debe mostrar la presencia de un solo componente). La concentración de proteína enzimática puede determinarse mediante análisis de aminoácidos, y la actividad de la fitasa en las unidades de FYT, puede determinarse como se describe en los ejemplos. La actividad específica es una característica de la variante de fitasa específica en cuestión, y se calcula como la actividad de fitasa medida en unidades FYT por mg de proteína enzimática de variante de fitasa.

Rendimiento en pienso para animales.

[0097] En un aspecto particular, la fitasa de la divulgación tiene un rendimiento mejorado en el pienso para animales en comparación con una fitasa de referencia. El rendimiento en el pienso para animales se puede

determinar mediante un modelo in vitro del ejemplo 6. Por consiguiente, en un aspecto preferido, la fitasa de la invención tiene un rendimiento mejorado en el pienso para animales, en donde el rendimiento se determina en un modelo in vitro, preparando muestras de pienso compuestas de un 30 % de harina de soja y un 70 % de harina de maíz con  $\text{CaCl}_2$  agregado a una concentración de 5 g de calcio por kg de pienso; preincubándolas a 40 °C y pH 3.0 durante 30 minutos, añadiendo, a continuación, pepsina (3000 U/g de pienso) y fitasa; incubando las muestras a 40 °C y pH 3.0 durante 60 minutos, siguiendo con pH 4.0 durante 30 minutos; deteniendo las reacciones; extrayendo ácido fítico e inositol-fosfatos mediante la adición de HCl a una concentración final de 0.5 M e incubando a 40 °C durante 2 horas, siguiendo con un ciclo de congelación y descongelación e incubación de 1 hora a 40 °C; separando el ácido fítico y los fosfatos de inositol mediante cromatografía iónica de alto rendimiento; determinando la cantidad de fósforo residual de fitato (IP6-P); calculando la diferencia en IP6-P residual entre la muestra en blanco tratada con fitasa y una muestra en blanco no tratada con fitasa (esta diferencia es IP6-P degradado); y expresando el IP6-P degradado de la fitasa de la divulgación en relación con el IP6-P degradado de la fitasa de referencia (por ejemplo, las fitasas que tienen las SEQ ID n.º 3 y 4).

[0098] La fitasa de la invención y la fitasa de referencia, por supuesto, se dosifican en la misma cantidad, preferiblemente en base a las unidades de actividad de la fitasa (FYT). Una dosis preferida es 125 FYT/kg de pienso. Otra dosis preferida es 250 FYT/kg de pienso. Las fitasas se pueden dosificar en forma de fitasas purificadas o en forma de sobrenadantes de fermentación. Las fitasas purificadas tienen preferiblemente una pureza de al menos el 95 %, según lo determinado mediante SDS-PAGE.

[0099] En aspectos preferidos, el valor de IP6-P degradado de la fitasa purificada de la invención, en relación con el valor de IP6-P degradado de la fitasa de referencia, es al menos un 101 %, o al menos un 102 %, 103 %, 104 %, 105 %, 110 %, 115 %, o al menos un 120 %. En otras realizaciones preferidas, el valor de IP6-P degradado de la fitasa purificada de la invención, en relación con el valor de IP6-P degradado de la fitasa de referencia, es al menos un 125 %, 130 %, 140 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 190 % o al menos un 200 %. Preferiblemente, el valor de IP6-P degradado de la fitasa de la invención, en relación con el valor de IP6-P degradado de la fitasa de la SEQ ID n.º 2, es al menos un 105 %, 110 %, 113 %, 115 %, 120 %, 125 % o al menos un 130 %.

[0100] El rendimiento relativo de una fitasa de la invención también puede calcularse como el porcentaje del fósforo liberado por la fitasa de referencia.

[0101] En otro aspecto particular adicional, el rendimiento relativo de la fitasa de la invención puede calcularse como el porcentaje del fósforo liberado por la fitasa de la invención, con respecto a la cantidad de fósforo liberado por la fitasa de referencia.

[0102] En otros aspectos particulares, el rendimiento relativo de la fitasa de la invención es al menos del 105 %, preferiblemente al menos del 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o al menos del 200 %.

secuencias y constructos de ácidos nucleicos

[0103] La presente invención también se refiere a secuencias de ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una variante de fitasa de la invención.

[0104] El término "secuencia de ácidos nucleicos aislada" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que está esencialmente libre de otras secuencias de ácidos nucleicos, por ejemplo, que son al menos aproximadamente un 20 % puras, preferiblemente al menos aproximadamente un 40 % puras, más preferiblemente al menos aproximadamente un 60 % puras incluso más preferiblemente al menos aproximadamente un 80 % puras, y lo más preferible al menos aproximadamente un 90 % puras según se determina mediante electroforesis en agarosa. Por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos aislada puede obtenerse mediante procedimientos de clonación estándar utilizados en ingeniería genética para reubicar la secuencia de ácido nucleico de su ubicación natural a un sitio diferente donde se reproducirá. Los procedimientos de clonación pueden implicar la escisión y el aislamiento de un fragmento de ácido nucleico deseado que comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido, la inserción del fragmento en una molécula de vector y la incorporación del vector recombinante en una célula huésped donde se replicarán múltiples copias o clones de la secuencia de ácidos nucleicos. La secuencia de ácidos nucleicos puede ser de origen genómico, ADNc, ARN, semisintético, sintético, o cualquiera de sus combinaciones.

[0105] Las secuencias de ácidos nucleicos de la invención pueden prepararse introduciendo al menos una mutación en una secuencia codificante de fitasa de plantilla o una subsecuencia de la misma, en la que la secuencia de ácidos nucleicos mutante codifica una variante de fitasa. La introducción de una mutación en la secuencia de ácidos nucleicos para intercambiar un nucleótido por otro nucleótido puede realizarse por cualquiera de los métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, por mutagénesis dirigida, por mutagénesis aleatoria o por mutagénesis aleatoria dopada, enriquecida o localizada.

[0106] La mutagénesis aleatoria se realiza adecuadamente como mutagénesis aleatoria localizada o específica de la región en al menos tres partes del gen que se traduce a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la

pregunta, o dentro de todo el gen. Cuando la mutagénesis se realiza mediante el uso de un oligonucleótido, el oligonucleótido puede doparse o enriquecerse con los tres nucleótidos no progenitores durante la síntesis del oligonucleótido en las posiciones que deben cambiarse. El dopaje o el enriquecimiento pueden realizarse de modo que se eviten los codones de aminoácidos no deseados. El oligonucleótido dopado o enriquecido puede incorporarse en el ADN que codifica la enzima fitasa mediante cualquier técnica, utilizando, por ejemplo, PCR, LCR o cualquier ADN polimerasa y ligasa según se considere apropiado.

[0107] Preferiblemente, el dopaje se lleva a cabo utilizando el "dopaje aleatorio constante", en el que el porcentaje de tipo salvaje y de mutación en cada posición está predefinido. Además, el dopaje puede dirigirse hacia una preferencia por la introducción de ciertos nucleótidos, y por lo tanto una preferencia por la introducción de uno o más residuos de aminoácidos específicos. El dopaje se puede hacer, por ejemplo, para permitir la introducción de un 90 % de tipo salvaje y un 10 % de mutaciones en cada posición. Una consideración adicional en la elección de un esquema de dopaje se basa en restricciones genéticas y estructurales de proteínas.

[0108] La mutagénesis aleatoria puede localizarse beneficiosamente en una parte de la fitasa progenitora en cuestión. Esto puede, por ejemplo, ser ventajoso cuando se ha identificado que ciertas regiones de la enzima son de particular importancia para una propiedad dada de la enzima.

[0109] Los métodos alternativos para proporcionar variantes de la divulgación incluyen el barajado de genes, p.ej., como se describe en WO 95/22625 o en WO 96/00343, y el proceso de obtención de consenso como se describe en EP 897985.

#### Constructos de ácidos nucleicos

[0110] Un constructo de ácidos nucleicos comprende una secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención operativamente enlazada a una o más secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada en condiciones compatibles con las secuencias de control. Se entenderá que la expresión incluye cualquier paso involucrado en la producción del polipéptido que incluye, entre otros, la transcripción, la modificación postranscripcional, la traducción, la modificación postraduccional y la SEQrección.

[0111] El término "constructo de ácidos nucleicos", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácidos nucleicos, ya sea de cadena sencilla o doble, que se aísla de un gen natural o que se modifica para contener segmentos de ácidos nucleicos de una manera que de otro modo no existiría en la naturaleza. El término constructo de ácidos nucleicos es sinónimo del término "casete de expresión" cuando el constructo de ácidos nucleicos contiene las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia codificante de la presente invención.

[0112] El término "secuencias de control" se define aquí para incluir todos los componentes, que son necesarios o beneficiosos para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa o extranjera a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Dichas secuencias de control incluyen, pero no se limitan a, una secuencia líder, una secuencia de poliadenilación, una secuencia propeptídica, un promotor, una secuencia peptídica y un terminador de la transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor, y señales de parada transcripcional y traduccional. Las secuencias de control pueden proporcionarse con enlazadores con el fin de introducir sitios de restricción específicos que faciliten la unión de las secuencias de control con la región codificante de la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido.

[0113] El término "operativamente enlazado" denota en este documento una configuración en la que una secuencia de control se coloca en una posición apropiada con respecto a la secuencia codificante de la secuencia de polinucleótidos, de tal manera que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia codificante de un polipéptido.

[0114] Cuando se usa en este documento, el término "secuencia codificante" (CDS) significa una secuencia de nucleótidos, que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de su producto proteico. Los límites de la secuencia codificante se determinan generalmente mediante un marco de lectura abierto, que comienza normalmente con el codón de inicio ATG o codones de inicio alternativos como GTG y TTG La secuencia codificante puede ser una secuencia de ADN, ADNc o nucleótido recombinante.

#### Vector de expresión

[0115] El término "expresión" incluye cualquier paso involucrado en la producción del polipéptido que incluye, entre otros, la transcripción, la modificación postranscripcional, la traducción, la modificación postraduccional y la SEQrección.

[0116] El término "vector de expresión" se define en este documento como una molécula de ADN lineal o circular

que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de la invención y que está operativamente enlazado a nucleótidos adicionales que proporcionan su expresión.

5 [0117] Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una variante de fitasa de la invención puede expresarse usando un vector de expresión que típicamente incluye secuencias de control que codifican un promotor, operador, sitio de unión al ribosoma, señal de inicio de la traducción y, opcionalmente, un gen represor o varios genes activadores.

10 [0118] El vector de expresión recombinante que lleva la secuencia de ADN que codifica una variante de fitasa de la invención puede ser cualquier vector que pueda someterse convenientemente a procedimientos de ADN recombinante, y la elección del vector dependerá a menudo de la célula huésped en la que se introducirá. El vector puede ser tal que, cuando se introduce en una célula huésped, está integrado en el genoma de la célula huésped y se replica junto con el(los) cromosoma(s) en el(los) que ha sido integrado.

15 [0119] La variante de fitasa también puede coexpresarse junto con al menos otra enzima de interés para el pienso de animales, como fitasa, fosfatasa, xilanasas, galactanasas, alfa-galactosidasas, proteasa, fosfolipasa, amilasa y/o beta-glucanasa. Las enzimas pueden coexpresarse desde varios vectores, desde un solo vector, o utilizando una mezcla de ambas técnicas. Cuando se usan diferentes vectores, estos pueden tener diferentes marcadores seleccionables y diferentes orígenes de replicación. Cuando se usa un solo vector, los genes pueden expresarse a partir de uno o más promotores. Si se clona bajo la regulación de un promotor (di- o multicistrónico), el orden en que se clonan los genes puede afectar a los niveles de expresión de las proteínas. La variante de fitasa también puede expresarse como una proteína de fusión, es decir, que el gen que codifica la variante de fitasa se ha fusionado en el marco del gen que codifica otra proteína. Esta proteína puede ser otra enzima o un dominio funcional de otra enzima.

25 Células huésped

[0120] El término "célula huésped", como se usa en este documento, incluye cualquier tipo de célula que es susceptible de transformación, transfección, transducción y similares con un constructo de ácidos nucleicos que comprende un polinucleótido de la presente invención.

35 [0121] La presente invención también se refiere a células huésped recombinantes, que comprenden un polinucleótido de la presente invención, que se utilizan de manera favorable en la producción recombinante de los polipéptidos. Un vector que comprende un polinucleótido de la presente invención se introduce en una célula huésped de modo que el vector se mantiene como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico autorreplicante como se describió anteriormente. El término "célula huésped" abarca cualquier descendiente de una célula madre que no es idéntico a la célula madre debido a las mutaciones que se producen durante la replicación. La elección de una célula huésped dependerá en gran medida del gen que codifica el polipéptido y su fuente.

40 [0122] La célula huésped puede ser un microorganismo unicelular, por ejemplo, un procarionta, o un microorganismo no unicelular, por ejemplo, un eucariota.

45 [0123] Los microorganismos unicelulares útiles son células bacterianas, tales como bacterias gram positivas, que incluyen, entre otras, una célula de *Bacillus*, por ejemplo, de *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*; o una célula de *Streptomyces*, por ejemplo, *Streptomyces lividans* y *Streptomyces murinus*, o bacterias gram negativas como *E. coli* y *Pseudomonas sp.* En un aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus* o *Bacillus subtilis*. En otro aspecto preferido, la célula de *Bacillus* es un *Bacillus* alcalofílico.

55 [0124] La introducción de un vector en una célula huésped bacteriana puede, por ejemplo, efectuarse por transformación de protoplastos (ver, por ejemplo, Chang y Cohen, 1979, *Molecular General Genetics* 168: 111-115), utilizando células competentes (ver, por ejemplo, Young and Spizizin, 1961, *Journal of Bacteriology* 81: 823-829 o Dubnau y Davidoff-Abelson, 1971, *Journal of Molecular Biology* 56: 209-221), electroporación (ver, por ejemplo, Shigekawa y Dower, 1988, *Biotechniques* 6: 742-751), o conjugación (ver, por ejemplo, Koehler y Thorne, 1987, *Journal of Bacteriology* 169: 5771-5278).

60 [0125] La célula huésped también puede ser un eucariota, tal como una célula de mamífero, inSEQto, planta o fúngica.

65 [0126] En un aspecto preferido, la célula huésped es una célula fúngica. "Hongos" como se usa en el presente documento incluye los filos Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota y Zygomycota (como se define por Hawksworth et al., In, Ainsworth y Bisby's *Dictionary of The Fungi*, 8ª edición, 1995, CAB International, University

Press, Cambridge, Reino Unido) así como Oomycota (como se cita en Hawksworth et al., 1995, supra, página 171) y todos los hongos mitospóricos (Hawksworth et al., 1995, supra).

[0127] En un aspecto más preferido, la célula huésped fúngica es una célula de levadura. "Levadura", tal como se usa en el presente documento, incluye levadura ascosporógena (Endomycetales), levadura basidiosporógena y levadura perteneciente a los fungi imperfecti (Blastomycetes). Dado que la clasificación de la levadura puede cambiar en el futuro, para los fines de esta invención, la levadura se definirá como se describe en *Biology and Activities of Yeast* (Skinner, F.A., Passmore, S.M., y Davenport, R.R., eds, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series n.º 9, 1980).

[0128] En un aspecto aún más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Yarrowia*.

[0129] En un aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis* o *Saccharomyces oviformis*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Kluyveromyces lactis*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Yarrowia lipolytica*.

[0130] En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica es una célula fúngica filamentosa. Los "hongos filamentosos" incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycota y Oomycota (según lo definido por Hawksworth et al., 1995, supra). Los hongos filamentosos se caracterizan generalmente por una pared micelial compuesta de quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo es por elongación hifal y el catabolismo de carbono es obligatoriamente aeróbico. Por el contrario, el crecimiento vegetativo por levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* se debe a la brotación de un talo unicelular y el catabolismo del carbono puede ser fermentativo.

[0131] En un aspecto aún más preferido, la célula hospedadora fúngica filamentosa es una célula de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filobasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolyposcladium*, *Trametes* o *Trichoderma*.

[0132] En un aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochromum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides* o *Fusarium venenatum*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de cepa *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregieia*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis pannocinta*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa* o *Ceriporiopsis subvermisporea*, *Coprinus cinereus*, *Coriolus hirsutus*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus eryngii*, *Thielavia terrestris*, *Trametes villosa*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*.

[0133] Las células fúngicas pueden transformarse mediante un proceso que implica la formación de protoplastos, la transformación de los protoplastos y la regeneración de la pared celular de una manera conocida per se. Los procedimientos adecuados para la transformación de células huésped de *Aspergillus* y *Trichoderma* se describen en EP 238 023 y Yelton et al., 1984, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 81: 1470-1474. Los métodos adecuados para transformar especies de *Fusarium* se describen en Malardier et al., 1989, *Gene* 78: 147-156 y WO 96/00787. La levadura puede transformarse utilizando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, In Abelson, J.N. y Simon, M.I., editores, *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology*, volumen 194, págs 182-187, Academic Press, Inc., Nueva York; Ito et al., 1983, *Journal of Bacteriology* 153: 163; y Hinnen et al., 1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 75: 1920.

Métodos de producción

[0134] La presente invención también se refiere a métodos para producir una fitasa de la presente invención que comprende (a) cultivar una célula huésped en condiciones propicias para la producción de la fitasa; y (b) recuperar la fitasa.

[0135] En los métodos de producción de la presente invención, las células se cultivan en un medio nutriente adecuado para la producción del polipéptido usando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula

se puede cultivar mediante el cultivo en matraz de agitación y la fermentación a pequeña escala o gran escala (incluyendo fermentaciones continuas, por lote, por lote alimentado o de estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales realizadas en un medio adecuado y en condiciones adecuadas que permiten que el polipéptido sea expresado y/o aislado. El cultivo tiene lugar en un medio nutriente adecuado que comprende fuentes de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Los medios adecuados están disponibles en los proveedores comerciales o pueden prepararse de acuerdo con las composiciones publicadas (p. ej., en los catálogos de la American Type Culture Collection). Si el polipéptido se SEQreta en el medio nutriente, puede recuperarse directamente del medio. Si el polipéptido no se SEQreta, puede recuperarse de los lisados celulares.

[0136] El polipéptido resultante se puede recuperar usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido puede recuperarse del medio nutriente mediante procedimientos convencionales que incluyen, entre otros, centrifugación, filtración, extracción, SEQado por pulverización, evaporación o precipitación.

[0137] Los polipéptidos de la presente invención pueden purificarse mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, que incluyen, entre otros, cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, hidrofóbica, cromatoenfoco y exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, enfoque isoelectrico preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio), SDS-PAGE o extracción (ver, por ejemplo, Purificación De Proteínas, J.-C. Janson y Lars Ryden, editores, VCH Publishers, Nueva York, 1989).

#### Plantas transgénicas

[0138] La presente divulgación también se refiere a una planta transgénica, parte de planta o célula vegetal que se ha transformado con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad de fitasa de la presente invención para expresar y producir el polipéptido en cantidades recuperables. El polipéptido puede recuperarse de la planta o de la parte de la planta. Alternativamente, la planta o parte de planta que contiene el polipéptido recombinante se puede usar como tal para mejorar la calidad de alimentos o piensos, p. ej., mejorando el valor nutricional, la palatabilidad y las propiedades reológicas, o destruir un factor antinutritivo.

[0139] En un aspecto particular, el polipéptido se dirige a las vacuolas de almacenamiento de endospermo en semillas. Esto se puede obtener sintetizándolo como un precursor con un péptido señal adecuado, ver Horvath et al. en PNAS, 15 de febrero de 2000, vol. 97, n.º 4, p. 1914-1919.

[0140] La planta transgénica puede ser dicotiledónea (una dicot) o monocotiledónea (una monocot) o variantes modificadas por ingeniería genética de la misma. Ejemplos de plantas monocotiledóneas son las gramíneas, tales como poa pratense (hierba azul, poa), hierba forrajera como festuca, lolium, hierba templada como agrostis y cereales, por ejemplo, trigo, avena, centeno, cebada, arroz, sorgo, triticale (híbrido estabilizado de trigo (Triticum) y centeno (SEQale), y maíz). Ejemplos de plantas dicotiledóneas son tabaco, las leguminosas, como girasol (Helianthus), algodón (Gossypium), altramuces, patatas, remolacha azucarera, arveja, frijol y soja, y plantas crucíferas (familia Brassicaceae), tales como coliflor, colza, y el organismo modelo estrechamente relacionado Arabidopsis thaliana. Las plantas bajas en fitato como las descritas, por ejemplo, en patente EE. UU. n.º 5.689.054 y patente EE. UU. n.º 6.111.168 son ejemplos de plantas por ingeniería genética.

[0141] Ejemplos de partes de planta son tallo, callo, hojas, raíz, frutos, semillas y tubérculos, así como los tejidos individuales que comprenden estas partes, p. ej., epidermis, mesófilo, parénquima, tejidos vasculares y meristemas. También los compartimentos específicos de células vegetales, tales como cloroplastos, apoplastos, mitocondrias, vacuolas, peroxisomas y citoplasma, se consideran una parte de la planta. Además, cualquier célula vegetal, independientemente del origen del tejido, se considera una parte de la planta. Del mismo modo, las partes de la planta, tales como las células y tejidos específicos aislados para facilitar la utilización de la divulgación, también se consideran partes de la planta, por ejemplo, embriones, endospermos, aleurona y tegumentos. También se incluyen dentro del alcance de la presente divulgación los descendientes de tales plantas, partes de plantas y células vegetales.

[0142] La planta transgénica o célula vegetal que expresa un polipéptido de la presente invención puede construirse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. En resumen, la planta o célula vegetal se construye incorporando uno o más constructos de expresión que codifican un polipéptido de la presente invención en el genoma huésped vegetal y propagando la planta modificada o célula vegetal resultante en una planta o célula vegetal transgénica.

[0143] El constructo de expresión es, convenientemente, un constructo de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido de la presente invención operativamente enlazado con secuencias reguladoras apropiadas requeridas para la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos en la planta o parte de la planta elegida. Además, el constructo de expresión puede comprender un marcador seleccionable útil para identificar las células huésped en las que se ha integrado el constructo de expresión, y las

secuencias de ADN necesarias para la introducción del constructo en la planta en cuestión (este último depende del método de introducción de ADN que se va a utilizar) .

[0144] La elección de secuencias reguladoras, tales como secuencias promotoras y terminadoras y opcionalmente secuencias de señal o tránsito, se determina, por ejemplo, en función de cuándo, dónde y cómo se desea expresar el polipéptido. Por ejemplo, la expresión del gen que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser constitutiva o inducible, o puede ser específica de desarrollo, fase o tejido, y el producto genético puede ser dirigido a un compartimento celular, tejido o parte de planta específicos tales como semillas u hojas. Las secuencias reguladoras están, por ejemplo, descritas por Tague et al., 1988, *Plant Physiology* 86: 506.

[0145] Para la expresión constitutiva, se pueden usar los siguientes promotores: el promotor 35S-CaMV (Franck et al., 1980, *Cell* 21: 285-294), la ubiquitina de maíz 1 (Christensen AH, Sharrock RA y Quail 1992. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation) o el promotor de la actina del arroz 1 (*Plant Mo. Biol.* 18, 675-689.; Zhang W, McElroy D. y Wu R 1991, Analysis of rice Act1 5' region activity in transgenic rice plants. *Plant Cell* 3, 1155-1165). Los promotores específicos de órgano pueden ser, por ejemplo, un promotor de tejidos sumidero de almacenamiento tales como semillas, tubérculos de patata y frutos (Edwards y Coruzzi, 1990, *Ann. Rev. Genet.* 24: 275-303), o de tejidos sumidero metabólicos como los meristemas (Ito et al., 1994, *Plant Mol. Biol.* 24: 863-878), un promotor específico de semilla tal como los promotores de glutelina, prolamina, globulina o albúmina del arroz (Wu et al., 1998, *Plant and Cell Physiology* 39: 885-889.), un promotor de Vicia faba de la leguminosa B4 y el gen de proteína de semilla desconocido de Vicia faba (Conrad et al., 1998, *Journal of Plant Physiology* 152: 708-711), un promotor de una proteína de cuerpo aceitoso de semilla (Chen et al., 1998, *Plant and Cell Physiology* 39: 935-941), el promotor de la proteína de almacenamiento napA de *Brassica napus*, o cualquier otro promotor específico de semilla conocido en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en WO 91/14772. Además, el promotor puede ser un promotor específico de hoja tal como el promotor rbcS del arroz o del tomate (Koyzuka et al., 1993, *Plant Physiology* 102: 991-1000, el promotor del gen de la adenina metiltransferasa del virus de la clorella (Mitra y Higgins, 1994, *Plant Molecular Biology* 26: 85-93), o el promotor del gen aldP del arroz (Kagaya et al., 1995, *Molecular and General Genetics* 248: 668-674.), o un promotor inducible por herida como el promotor pin2 de la patata (Xu et al., 1993, *Plant Molecular Biology* 22: 573-588). Del mismo modo, el promotor puede ser inducible por tratamientos abióticos como la temperatura, la sequía o modificaciones en la salinidad, o inducible por sustancias aplicadas exógenamente que activan el promotor, p. ej., etanol, estrógenos, hormonas vegetales tales como etileno, ácido abscísico, ácido giberélico y/o metales pesados.

[0146] También se puede usar un elemento potenciador del promotor para lograr una mayor expresión del polipéptido en la planta. Por ejemplo, el elemento potenciador del promotor puede ser un intrón que se coloca entre el promotor y la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención. Por ejemplo, Xu et al., 1993, supra, describen el uso del primer intrón del gen de la actina 1 del arroz para potenciar la expresión.

[0147] Aún más, el uso del codón puede optimizarse para que la especie de planta en cuestión mejore la expresión (ver Horvath et al., mencionado anteriormente).

[0148] El gen marcador seleccionable y cualquier otra parte del constructo de expresión pueden elegirse entre los disponibles en la técnica.

[0149] El constructo de ácidos nucleicos se incorpora al genoma de la planta de acuerdo con técnicas convencionales conocidas en la técnica, que incluyen transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación mediada por virus, microinyección, bombardeo de partículas, transformación biolística y electroporación (Gasser et al., 1990, *Science* 244: 1293; Potrykus, 1990, *Bio/Technology* 8: 535; Shimamoto et al., 1989, *Nature* 338: 274).

[0150] En la actualidad, la transferencia de genes mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es el método elegido para generar dicots transgénicos (para una revisión, véase Hooykas y Schilperoort, 1992, *Plant Molecular Biology* 19: 15-38), y también se puede usar para transformar monocotiledóneas, aunque otros métodos de transformación se usan con más frecuencia para estas plantas. En la actualidad, el método elegido para generar monocots transgénicos, que complementa el enfoque de *Agrobacterium*, es el bombardeo de partículas (partículas microscópicas de oro o de tungsteno recubiertas con el ADN transformante) de callos embrionarios o de embriones en desarrollo (Christou, 1992, *Plant Journal* 2: 275-281; Shimamoto, 1994, *Current Opinion Biotechnology* 5: 158-162; Vasil et al., 1992, *Bio/Technology* 10: 667-674). Un método alternativo para la transformación de monocotiledóneas se basa en la transformación de protoplastos como describen Omirulleh et al., 1993, *Plant Molecular Biology* 21: 415-428.

[0151] Después de la transformación, los transformantes que han incorporado el constructo de expresión se

seleccionan y regeneran en plantas completas de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. A menudo, el procedimiento de transformación está diseñado para la eliminación selectiva de genes de selección durante la regeneración o en las siguientes generaciones usando, por ejemplo, cotransformación con dos constructos de ADN-T separados o escisión específica del sitio del gen de selección mediante una recombinasa específica.

[0152] La presente divulgación también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención que comprende (a) cultivar una planta transgénica o una célula vegetal que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido con actividad de fitasa de la presente invención en condiciones propicias para la producción del polipéptido ; y (b) recuperar el polipéptido.

#### Composiciones y usos

[0153] En otros aspectos adicionales, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden un polipéptido de la presente invención, así como a métodos para usarlas.

[0154] Las composiciones de polipéptidos pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica y pueden estar en forma de líquido o composición SEQa. Por ejemplo, la composición polipeptídica puede estar en forma de granulados o microgranulados. El polipéptido que se va a incluir en la composición puede estabilizarse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica.

[0155] La fitasa de la invención se puede usar para la degradación, en cualquier contexto industrial, de, por ejemplo, fitato, ácido fítico y/o los mono-, di-, tri-, tetra- y/o pentafofosfatos de mioinositol. Es bien sabido que los restos fosfato de estos compuestos quelan cationes divalentes y trivalentes, tales como iones metálicos, entre otros los iones esenciales de calcio, hierro, zinc y magnesio, así como los oligoelementos manganeso, cobre y molibdeno. Además, el ácido fítico también se une en cierta medida a las proteínas mediante la interacción electrostática.

[0156] Por consiguiente, los usos preferidos de los polipéptidos de la invención son las preparaciones de piensos para animales (incluyendo alimentos para humanos) o aditivos para tales preparaciones.

[0157] En un aspecto particular, el polipéptido de la invención se puede usar para mejorar el valor nutricional de un pienso para animales. Los ejemplos no limitantes de mejora del valor nutricional de los piensos para animales (incluyendo los alimentos para humanos) son: mejorar la digestibilidad de los alimentos; promover el crecimiento del animal; mejorar la utilización del alimento; mejorar la biodisponibilidad de proteínas; aumentar el nivel de fosfato digerible; mejorar la liberación y/o degradación del fitato; mejorar la biodisponibilidad de oligoelementos; mejorar la biodisponibilidad de macrominerales; eliminar la necesidad de agregar fosfato suplementario, oligoelementos y/o macrominerales; y/o mejorar la calidad de la cáscara de huevo. Por lo tanto, el valor nutricional del pienso aumenta, y la tasa de crecimiento y/o el aumento de peso y/o la conversión de alimento (es decir, el peso del alimento ingerido en relación con el aumento de peso) del animal puede mejorarse.

[0158] Además, el polipéptido de la invención se puede usar para reducir el nivel de fitato del estiércol.

#### Animales, piensos y aditivos para piensos

[0159] El término animal incluye a todos los animales, incluidos los seres humanos. Ejemplos de animales son los rumiantes y los no rumiantes. Los animales rumiantes incluyen, por ejemplo, animales tales como ovejas, cabras y vacas, por ejemplo, vacas como el ganado para carne y vacas lecheras. En un aspecto particular, el animal es un animal no rumiante. Los animales no rumiantes incluyen animales monogástricos, p. ej., cerdos o ganado porcino (incluyendo, entre otros, lechones, cerdos en crecimiento y cerdas); aves de corral tales como pavos, patos y pollos (incluyendo, entre otros, pollos de engorde, ponedoras); peces (incluyendo, entre otros, salmón, trucha, tilapia, bagre y carpa); y crustáceos (incluyendo, entre otros, camarones y langostinos).

[0160] El término pienso o composición de pienso significa cualquier compuesto, preparado, mezcla o composición adecuada o destinada a ser ingerida por un animal.

[0161] En el uso de acuerdo con el polipéptido, se puede alimentar al animal antes, después o simultáneamente a la dieta. Esto último es lo preferido.

[0162] En un aspecto particular, el polipéptido, en la forma en que se añade al pienso o cuando se incluye en un aditivo para piensos, es sustancialmente puro. En un aspecto particular está bien definido. El término "bien definido" significa que el preparado de fitasa tiene una pureza de al menos el 50 % según lo determinado por cromatografía de exclusión por tamaño (consulte el ejemplo 12 de WO 01/58275). En otros aspectos particulares, la preparación de fitasa es al menos un 60, 70, 80, 85, 88, 90, 92, 94, o al menos un 95 % pura, tal como se determina mediante este método.

[0163] Un preparado de polipéptidos sustancialmente puro y/o bien definido es beneficioso. Por ejemplo, es

mucho más fácil dosificar correctamente en el pienso un polipéptido que está esencialmente libre de interferir o contaminar otros polipéptidos. El término "dosificar correctamente" se refiere en particular al objetivo de obtener resultados consistentes y constantes, y a la capacidad de optimizar la dosis en función del efecto deseado.

5 [0164] Para el uso en piensos para animales, sin embargo, el polipéptido de fitasa de la invención no necesita ser tan puro; puede, por ejemplo, incluir otros polipéptidos, en cuyo caso podría denominarse preparado de fitasa.

10 [0165] El preparado de fitasa puede ser (a) añadido directamente al pienso (o utilizado directamente en un proceso de tratamiento de proteínas), o (b) puede usarse en la producción de una o más composiciones intermedias como aditivos o premezclas de pienso que posteriormente se añaden al pienso (o se utilizan en un proceso de tratamiento). El grado de pureza descrito anteriormente se refiere a la pureza del preparado polipeptídico original, usado ya sea de acuerdo con (a) o con (b) antes mencionados.

15 [0166] Los preparados de polipéptidos con purezas de este orden de magnitud se pueden obtener en particular utilizando métodos de producción recombinantes, mientras que, cuando la proteasa se produce mediante métodos de fermentación tradicionales, no se obtienen tan fácilmente y también están sujetos a una variación mucho mayor entre un lote y otro cuando el polipéptido se produce mediante métodos de fermentación tradicionales.

20 [0167] Dicho preparado de polipéptidos puede, por supuesto, mezclarse con otros polipéptidos.

25 [0168] El polipéptido se puede añadir al pienso en cualquier forma, ya sea como un polipéptido relativamente puro o en mezcla con otros componentes destinados a la adición al pienso para animales, es decir, en forma de aditivos de piensos para animales, tales como las llamadas premezclas de piensos para animales.

[0169] En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a composiciones para usar en piensos para animales, tales como piensos para animales y aditivos de piensos para animales, p. ej., premezclas

30 [0170] Además del polipéptido de la invención, los aditivos en piensos para animales de la invención contienen al menos una vitamina liposoluble, y/o al menos una vitamina hidrosoluble, y/o al menos un oligoelemento. El aditivo para piensos también puede contener al menos un macromineral.

35 [0171] Otros ingredientes opcionales de aditivos para piensos son agentes colorantes, p. ej., carotenoides tales como betacaroteno, astaxantina y luteína; compuestos aromáticos; estabilizadores; péptidos antimicrobianos; ácidos grasos poliinsaturados; especies reactivas generadoras de oxígeno; y/o al menos otro polipéptido seleccionado de entre la fitasa (EC 3.1.3.8 o 3.1.3.26); fosfatasa (EC 3.1.3.1; EC 3.1.3.2; EC 3.1.3.39); xilanasa (EC 3.2.1.8); galactanasa (EC 3.2.1.89); alfa-galactosidasa (EC 3.2.1.22); proteasa (EC 3.4.-.-), fosfolipasa A1 (EC 3.1.1.32); fosfolipasa A2 (EC 3.1.1.4); lisofosfolipasa (EC 3.1.1.5); fosfolipasa C (3.1.4.3); fosfolipasa D (EC 3.1.4.4); amilasa tal como, por ejemplo, alfa-amilasa (EC 3.2.1.1); y/o beta-glucanasa (EC 3.2.1.4 o EC 3.2.1.6).

[0172] En un aspecto particular, estos otros polipéptidos están bien definidos (como se ha definido anteriormente para preparados de fitasa).

45 [0173] La fitasa de la invención también puede combinarse con otras fitasas, por ejemplo, fitasas ascomicetas tales como fitasas de *Aspergillus*, por ejemplo derivadas de *Aspergillus ficuum*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus awamori*; o fitasas de basidiomicetos, por ejemplo, derivadas de *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, *Trametes pubescens* o *Paxillus involutus*; o derivados, fragmentos o variantes de las mismas que tienen actividad de fitasa.

50 [0174] Por lo tanto, en aspectos preferidos del uso en piensos para animales de la invención, y en aspectos preferidos del aditivo de piensos para animales y piensos para animales de la invención, la fitasa de la invención se combina con dichas fitasas.

55 [0175] Los ejemplos de péptidos antimicrobianos (PAM) son CAP18, Leucocina A, Tiritricina, Protegrina-1, Tanatina, Defensina, Lactoferrina, Lactoferrina y Ovispirina, como la Novispirina (Robert Lehrer, 2000), Plectasinas y Estatinas, incluyendo los compuestos y los suplementos de polipéptidos. en WO 03/044049 y WO 03/048148, así como variantes o fragmentos de los anteriores que conservan actividad antimicrobiana.

60 [0176] Los ejemplos de polipéptidos antifúngicos (AFP) son los péptidos *Aspergillus giganteus* y *Aspergillus niger*, así como sus variantes y fragmentos que conservan la actividad antifúngica, tal como se describe en WO 94/01459 y WO 02/090384.

[0177] Ejemplos de ácidos grasos poliinsaturados son los ácidos C18, C20 y C22, tales como el ácido araquidónico, ácido docosohexaenoico, ácido eicosapentaenoico y ácido gamma-linoleico.

[0178] Ejemplos de especies que generan oxígeno reactivo son sustancias químicas tales como perborato, persulfato o percarbonato; y polipéptidos tales como una oxidasa, una oxigenasa o una sintetasa.

5 [0179] Por lo general, las vitaminas liposolubles e hidrosolubles, así como los oligoelementos, forman parte de la llamada premezcla destinada a ser añadida al pienso, mientras que los macrominerales generalmente se añaden por separado al pienso. Cualquiera de estos tipos de composición, cuando se enriquece con un polipéptido de la invención, es un aditivo para piensos de la divulgación.

10 [0180] En un aspecto particular, el aditivo para alimentos de animales de la invención está destinado a ser incluido (o se prescribe que debe incluirse) en dietas o piensos para animales a niveles del 0.01 al 10.0 %; más particularmente del 0.05 al 5.0 %; o del 0.2 al 1.0 % (% significa g de aditivo por 100 g de pienso). Esto es así en particular para las premezclas.

15 [0181] Las siguientes son listas no exclusivas de ejemplos de estos componentes: Ejemplos de vitaminas liposolubles son la vitamina A, la vitamina D3, la vitamina E y la vitamina K, p. ej., la vitamina K3.

20 [0182] Ejemplos de vitaminas hidrosolubles son la vitamina B12, la biotina y la colina, la vitamina B1, la vitamina B2, la vitamina B6, la niacina, el ácido fólico y el pantotenato, p. ej., Ca-D-pantotenato.

[0183] Ejemplos de oligoelementos son el manganeso, el zinc, el hierro, el cobre, el yodo, el selenio y el cobalto.

25 [0184] Ejemplos de macrominerales son el calcio, el fósforo y el sodio.

[0185] Los requisitos nutricionales de estos componentes (ejemplificados con aves de corral y lechones/cerdos) se enumeran en la tabla A de WO 01/58275. Requisito nutricional significa que estos componentes deben proporcionarse en la dieta en las concentraciones indicadas.

30 [0186] Alternativamente, el aditivo de piensos para animales de la divulgación comprende al menos uno de los componentes individuales especificados en la tabla A de WO 01/58275. "Al menos uno" significa cualquiera entre, uno o más de uno, o dos, o tres, o cuatro y así sucesivamente hasta los trece o hasta los quince componentes individuales. Más específicamente, este "al menos un" componente individual se incluye en el aditivo de la divulgación en una cantidad tal que proporcione una concentración en el pienso dentro del intervalo  
35 indicado en la columna cuatro, o la columna cinco, o la columna seis de la tabla A.

[0187] La presente invención también se refiere a composiciones de piensos para animales. Las composiciones o dietas de piensos para animales tienen un contenido relativamente alto de proteínas. Las dietas de aves y cerdos se pueden caracterizar como se indica en la tabla B de WO 01/58275, columnas 2-3. Las dietas de peces se pueden caracterizar como se indica en la columna 4 de esta tabla B. Además, estas dietas de peces usualmente tienen un contenido de grasa bruta de 200-310 g/kg.

40 [0188] Una composición de pienso para animales según la divulgación tiene un contenido de proteína bruta de 50-800 g/kg, y además comprende al menos un polipéptido tal como se reivindica en el presente documento.

45 [0189] Además, o como alternativa (al contenido de proteína bruta indicado anteriormente), la composición del pienso para animales de la divulgación tiene un contenido de energía metabolizable de 10-30 MJ/kg; y/o un contenido de calcio de 0.1-200 g/kg; y/o un contenido de fósforo disponible de 0.1 - 200 g/kg; y/o un contenido de metionina de 0.1-100 g/kg; y/o un contenido de metionina más cisteína de 0.1-150 g/kg; y/o un contenido de lisina de 0.5-50 g/kg.

50 [0190] En los aspectos particulares, el contenido de energía metabolizable, proteína bruta, calcio, fósforo, metionina, metionina más cisteína y/o lisina está dentro de cualquiera de los rangos 2, 3, 4 o 5 en la tabla B de WO 01/58275 (R. 2-5).

55 [0191] La proteína bruta se calcula como nitrógeno (N) multiplicado por un factor 6.25, es decir, proteína bruta (g/kg) = N (g/kg) x 6.25. El contenido de nitrógeno se determina mediante el método de Kjeldahl (A.O.A.C., 1984, Official Methods of Analysis 14<sup>a</sup> ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington DC).

60 [0192] La energía metabolizable se puede calcular sobre la base de la publicación de la NRC Nutrient requirements in swine, novena edición revisada 1988, subcomité de nutrición porcina, comité de nutrición animal, consejo de agricultura, consejo nacional de investigación. National Academy Press, Washington, D.C., págs. 2-6, y la European Table of Energy Values for Poultry Feed-stuffs, Spelderholt centre for poultry research and extension, 7361 DA Beekbergen, Países Bajos. Grafisch bedrijf Ponsen & looijen bv, Wageningen. ISBN 90-71463-12-5.  
65

- 5 [0193] El contenido dietético del calcio, el fósforo y los aminoácidos disponibles en dietas completas de animales se calcula sobre la base de tablas de piensos tales como Veevoedertabel 1997, gegevens over chemische samenstelling, verteerbaarheid en voederwaarde van voedermiddelen, Central Veevoederbureau, Runderweg 6, 8219 pk Lelystad. ISBN 90-72839-13-7.
- 10 [0194] En un aspecto particular, la composición de pienso para animales de la divulgación contiene al menos una proteína. La proteína puede ser una proteína animal, como la harina de carne y de hueso, y/o la harina de pescado; o puede ser una proteína vegetal. El término proteínas vegetales tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier compuesto, composición, preparado o mezcla que incluye al menos una proteína que se deriva o se origina a partir de un vegetal, incluyendo proteínas modificadas y derivados de proteínas. En aspectos particulares, el contenido de proteínas de las proteínas vegetales es de al menos un 10, 20, 30, 40, 50, o 60 % (p/p).
- 15 [0195] Las proteínas vegetales pueden derivarse de fuentes de proteínas vegetales, tales como legumbres y cereales, por ejemplo, materiales de las plantas de las familias Fabaceae (Leguminosae), Cruciferaeae, Chenopodiaceae y Poaceae, como harina de soja, harina de altramuz y harina de colza.
- 20 [0196] En un aspecto particular, la fuente de proteína vegetal es el material de una o más plantas de la familia Fabaceae, p. ej., soja, altramuz, guisante o judía.
- [0197] En otro aspecto particular, la fuente de proteína vegetal es el material de una o más plantas de la familia Chenopodiaceae, p. ej., remolacha, remolacha azucarera, espinaca o quinoa.
- 25 [0198] Otros ejemplos de fuentes de proteínas vegetales son la colza, la semilla de girasol, la semilla de algodón y la col.
- [0199] La soja es una fuente de proteína vegetal preferida.
- 30 [0200] Otros ejemplos de fuentes de proteínas vegetales son cereales como cebada, trigo, centeno, avena, maíz, arroz, triticale y sorgo.
- 35 En otros aspectos particulares, la composición de pienso para animales de la divulgación contiene un 0-80 % de maíz; y/o un 0-80 % de sorgo; y/o un 0-70 % de trigo; y/o un 0-70 % de cebada; y/o un 0-30 % de avena; y/o un 0-40 % de harina de soja; y/o un 0-25 % de harina de pescado; y/o un 0-25 % de harina de carne y hueso; y/o un 0-20 % de suero.
- 40 [0202] Las dietas de animales pueden, por ejemplo, fabricarse como pienso en puré (no granulado) o como alimento granulado. Típicamente, los piensos molidos se mezclan, y se añaden cantidades suficientes de vitaminas y minerales esenciales de acuerdo con las especificaciones para la especie en cuestión. Los polipéptidos se pueden añadir como formulaciones de polipéptidos sólidos o líquidos. Por ejemplo, una formulación de polipéptido sólido se añade típicamente antes o durante la etapa de mezcla; y típicamente se añade una preparación de polipéptido líquido después de la etapa de granulación. El polipéptido también puede incorporarse en un aditivo o premezcla para piensos.
- 45 [0203] La concentración final de polipéptidos en la dieta está dentro del rango de 0.01-200 mg de proteína polipeptídica por kg de dieta, por ejemplo en el rango de 5-30 mg de proteína polipeptídica por kg de dieta animal.
- 50 [0204] La fitasa de la invención, por supuesto, debe aplicarse en una cantidad eficaz, es decir, en una cantidad adecuada para mejorar la solubilización y/o mejorar el valor nutricional del pienso. Actualmente se contempla que el polipéptido se administre en una o más de las siguientes cantidades (rangos de dosificación): 0.01-200; 0.01-100; 0.5-100; 1-50; 5-100; 10-100; 0.05-50; o 0.10-10: todos estos rangos están en mg de proteína polipeptídica de fitasa por kg de pienso (ppm).
- 55 [0205] Para determinar mg de proteína polipeptídica de fitasa por kg de pienso, la fitasa se purifica a partir de la composición del pienso, y la actividad específica de la fitasa purificada se determina utilizando un ensayo relevante. La actividad de la fitasa de la composición del pienso como tal se determina también utilizando el mismo ensayo, y sobre la base de estas dos determinaciones, se calcula la dosis en mg de proteína fitasa por kg de pienso.
- 60 [0206] Los mismos principios se aplican para determinar la proteína polipeptídica fitasa en mg en aditivos para piensos. Por supuesto, si hay una muestra disponible de la fitasa utilizada para preparar el aditivo para piensos o el pienso, la actividad específica se determina a partir de esta muestra (no es necesario purificar la fitasa de la composición de pienso o de aditivo).
- 65

## Métodos para producir productos de fermentación

5 [0207] Otro aspecto más de la presente invención se refiere a los métodos para generar un producto de fermentación, tal como, por ejemplo, etanol, cerveza, vino, granos SEQos de destilería (DDG), en donde la fermentación se lleva a cabo en presencia de una fitasa producida por la presente invención. Ejemplos de procesos de fermentación incluyen, por ejemplo, los procesos descritos en WO 01/62947. La fermentación se lleva a cabo utilizando un microorganismo fermentador, como la levadura.

10 [0208] En un aspecto particular, la presente divulgación proporciona métodos para generar un producto de fermentación, que comprenden (a) fermentar (usando un microorganismo de fermentación, tal como levadura) un material que contiene carbohidratos (por ejemplo, almidón) en presencia de una fitasa de la presente invención y (b) generar el producto de fermentación a partir del material que contiene carbohidratos fermentado.

15 [0209] En un aspecto particular, la presente divulgación proporciona métodos para producir etanol, que comprenden (a) fermentar (usando un microorganismo de fermentación, tal como levadura) un material que contiene carbohidratos (por ejemplo, almidón) en presencia de una fitasa de la presente invención y producir o recuperar etanol a partir del material que contiene carbohidratos fermentado.

20 [0210] En otro aspecto, la presente divulgación proporciona métodos para producir etanol que comprenden a) hidrolizar almidón, por ejemplo, mediante un proceso de licuefacción y/o sacarificación, un proceso de hidrólisis de almidón en bruto, b) fermentar el almidón resultante en presencia de una fitasa del presente invención, y c) producir etanol.

25 [0211] La fitasa se puede agregar al proceso de fermentación en cualquier etapa adecuada y en cualquier composición adecuada, incluso sola o en combinación con otras enzimas, como una o más alfa-amilasas, glucoamilasas, proteasas y/o celulasas.

30 [0212] En otro aspecto, la presente divulgación proporciona métodos para producir etanol que comprenden hidrolizar biomasa y fermentar (usando un microorganismo fermentador, tal como levadura) la biomasa resultante en presencia de una fitasa de la presente invención.

**Ejemplos**

35 [0213] Los productos químicos utilizados son productos comerciales al menos de grado reactivo.

**Ejemplo 1:** Preparación de variantes, y determinación de actividad.Preparación de variantes de fitasa.40 Expresión de variantes de fitasa en *Aspergillus oryzae*

45 [0214] Los constructos que comprenden los genes de la variante de fitasa de *E. coli* en los ejemplos se usaron para construir vectores de expresión para *Aspergillus*. Los vectores de expresión de *Aspergillus* consisten en un casete de expresión basado en el promotor amilasa II neutra de *Aspergillus niger* fusionado a la secuencia líder no traducida de triosa fosfato isomerasa (Pna2/tpi) de *Aspergillus nidulans* y el terminador de amiloglucosidasa (Tamg) de *Aspergillus niger*. También presente en el plásmido estaba el marcador selectivo amdS de *Aspergillus nidulans* que permite el crecimiento en medios para *aspergillus* transformado donde la acetamida es la única fuente de nitrógeno. Los plásmidos de expresión para variantes de fitasa se transformaron en *Aspergillus* como se describe en Lassen et al. (2001), Applied and Environmental Microbiology, 67, 4701-4707..  
50 Para cada uno de los constructos, se aislaron, se purificaron y se cultivaron 4-6 cepas en placas de microtitulación. La expresión se determinó utilizando un sustrato de fosfato de p-nitrofenilo. La mejor cepa productora fue fermentada en matraces de agitación.

Purificación de variantes de fitasa de *E. coli*.

55 [0215] El sobrenadante de fermentación con la variante de fitasa se filtró a través de un sándwich de cuatro filtros de microfibras de vidrio Whatman (2.7, 1.6, 1.2 y 0.7 micrómetros). Después de esto, la solución se filtró a través de un filtro de parte superior de frasco Fast PES con un corte de 0.22 µm. A la solución se le añadió sulfato de amonio sólido dando una concentración final de 1.5 M y el pH se ajustó a 6.0. La solución se volvió un poco turbia y este precipitado se eliminó por filtración a través de un filtro de parte superior de frasco Fast PES con un corte de 0.22 µm.  
60

65 [0216] La solución que contenía fitasa se aplicó a una columna de butil-sefarosa, aproximadamente 50 ml en una columna XK26, utilizando como tampón A bis-tris (bis-(2-hidroxietil)imino-tris(hidroximetil)metano)) 25 mM + sulfato de amonio 1.5 M, pH 6.0, y como tampón B bis-tris 25 mM, pH 6.0. Las fracciones de la columna se

analizaron para determinar la actividad utilizando el ensayo de fosfatasa (ver más adelante) y las fracciones con actividad se agruparon.

[0217] Las fracciones agrupadas se dializaron extensamente frente a acetato de sodio 10 mM, pH 4.5. Después de la diálisis, se formó una precipitación menor y se eliminó por filtración a través de un filtro de parte superior de frasco Fast PES con un corte de 0.22 micrómetros. La variante de fitasa se purificó por cromatografía en SP Sepharose Fast Flow, aproximadamente 50 ml en una columna XK26, utilizando como tampón A acetato de sodio 50 mM, pH 4.5 y como tampón B acetato de sodio 50 mM + NaCl 1 M, pH 4.5. Las fracciones de la columna se analizaron para determinar la actividad utilizando el ensayo de fosfatasa (ver más adelante) y las fracciones con actividad se agruparon. Las fracciones combinadas se analizaron para determinar la actividad de la fitasa (ver más adelante) y se encontró que estaban activas (> 200 FYT/ml).

[0218] El peso molecular, estimado a partir de SDS-PAGE, era de aproximadamente 50-55 kDa y la pureza era > 95 %.

#### Determinación de la actividad fosfatasa.

[0219] 75 microlitros de solución enzimática con contenido de fitasa se dispensan en un pocillo de placa de microtitulación, p. ej., NUNC 269620 y se añaden 75 microlitros de sustrato (para preparar el sustrato, se disuelven dos tabletas de fosfato de p-nitrofenilo de 5 mg (Sigma, n.º de cat. N-9389) en 10 ml de tampón de acetato de sodio 0.1 M, pH 5.5). La placa se sella y se incuba durante 15 min., se agita a 750 rpm a 37 °C. Después del tiempo de incubación, se agregan 75 microlitros de reactivo de parada (el reactivo de parada es tetraborato de di-sodio 0.1 M en agua) y la absorbancia a 405 nm se mide en un espectrofotómetro de placa de microtitulación. Una unidad de fosfatasa se define como la actividad enzimática que libera 1 micromol de fosfato/min en las condiciones de reacción dadas (tampón ciego sustraído). Se determina que la absorbancia de 1 micromol de p-nitrofenol es de 56 UA (UA = unidades de absorbancia) en condiciones de ensayo.

#### Determinación de la actividad de la fitasa.

[0220] 75 microlitros de solución enzimática con contenido de fitasa, diluida adecuadamente en acetato de sodio 0.25 M, 0.005 % (p/v) de Tween-20, pH 5.5, se dispensa en un pocillo de placa de microtitulación, p. ej., NUNC 269620, y se agregan 75 microlitros de sustrato (preparados mediante la disolución de 100 mg de fitato de sodio de arroz (Aldrich Cat. n.º 274321) en 10 ml de tampón de acetato de sodio 0.25 M, pH 5.5). La placa se sella y se incuba durante 15 min. Se agita a 750 rpm a 37 °C. Después de la incubación, se añaden 75 microlitros de reactivo de parada (el reactivo de parada se prepara mezclando 10 ml de solución de molibdato (10 % (p/v) de hepta-molibdato de amonio en 0.25 % (p/v) de solución de amoníaco), 10 ml de vanadato de amonio (0.24 % de producto comercial de Bie&Berntsen, n.º cat. LAB17650), y 20 ml de 21.7 % (p/v) de ácido nítrico, y la absorbancia a 405 nm se mide en un espectrofotómetro de placa de microtitulación. La actividad de la fitasa se expresa en la unidad de FYT, un FYT es la cantidad de enzima que libera 1 micromol de ortofosfato inorgánico por minuto en las condiciones anteriores. Un valor absoluto para la actividad de fitasa medida se puede obtener por referencia a una curva estándar preparada a partir de diluciones apropiadas de fosfato inorgánico, o por referencia a una curva estándar hecha por diluciones de un preparado de enzima fitasa con actividad conocida (tal preparado enzimático estándar con una actividad conocida está disponible bajo pedido en Novozymes A/S, Krogshoejvej 36, DK-2880 Bagsvaerd).

#### **Ejemplo 2: Actividad específica**

[0221] La actividad específica de una variante de fitasa se determina en muestras altamente purificadas dializadas frente a acetato de sodio 250 mM, pH 5.5. La pureza se verifica de antemano en un gel de poliacrilamida con SDS que muestra la presencia de un solo componente.

[0222] La concentración de proteína se determina mediante análisis de aminoácidos de la siguiente manera: una parte alícuota de la muestra se hidroliza en HCl 6 N, fenol al 0.1 % durante 16 horas a 110 °C en un tubo de vidrio evacuado. Los aminoácidos resultantes se cuantifican utilizando un sistema de análisis de aminoácidos Applied Biosystems 420A operado de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A partir de las cantidades de los aminoácidos, se puede calcular la masa total, y por lo tanto también la concentración de proteína en la parte alícuota hidrolizada.

[0223] La actividad de la fitasa se determina en unidades de FYT como se describe en el ejemplo 1 ("Determinación de la actividad de la fitasa"), y la actividad específica se calcula como la actividad de la fitasa medida en unidades de FYT por mg de proteína de enzima variante de fitasa.

#### **Ejemplo 3: Termoestabilidad**

[0224] Una parte alícuota de la muestra de proteína de variante de fitasa de E. coli (purificada como se describe en el ejemplo 1) o bien se desalinizó y se cambió de tampón a acetato de sodio 20 mM, pH 4.0 usando una

columna PD-10 preenvasada, o bien se dializó frente a 2 x 500 ml de acetato de sodio 20 mM, pH 4.0 a 4 °C en una etapa de 2-3 h, seguida de una etapa durante la noche. La muestra se filtró a 0.45 µm y se diluyó con tampón hasta aprox. 2 unidades A280. El tampón de diálisis se utilizó como referencia en la calorimetría diferencial de barrido (DSC). Las muestras se desgasificaron utilizando succión al vacío y agitando durante aprox. 10 minutos.

[0225] Se realizó una exploración DSC en un MicroCal VP-DSC a una velocidad de exploración constante de 1.5 °C/min de 20-90 °C. El tratamiento de los datos se realizó con el software MicroCal Origin (versión 4.10), y la temperatura de desnaturalización, Td (también llamada temperatura de fusión, Tf) se define como la temperatura en el vértice del pico en el termograma.

[0226] Los resultados de DSC para las variantes de fitasa de E. coli se resumen en la tabla 2 a continuación.

Tabla 2. Termoestabilidad comparativa de las fitasas de E. coli

Variante	Modificación	Td 1ª exploración (°C)
Ec-phyt01	A116T	61.8
Ec-phyt02	SEQ ID n.º 2	57.6
Ec-phyt06	G52C/A99C = A	60.1
Ec-phyt07	D31C/L177C = C	53.4
Ec-phyt08	T141C/V200C = B	58.7
Ec-phyt09	G52C/A99C/T141C/V200C/D31C/L177C/L410LR = A/B/C/L410LR	66.1

**Ejemplo 4:** Perfil de temperatura.

[0227] El perfil de temperatura (actividad de la fitasa en función de la temperatura) se determinó para la fitasa de E. coli y las variantes en el rango de temperatura de 20-90 °C esencialmente como se ha descrito anteriormente ("Determinación de la actividad de la fitasa"). Sin embargo, las reacciones enzimáticas (solución enzimática que contiene fitasa de 100 microlitros + sustrato de 100 microlitros) se realizaron en tubos de PCR en lugar de placas de microtitulación. Después de un período de reacción de 15 minutos a la temperatura deseada, los tubos se enfriaron a 20 °C durante 20 segundos y se transfirieron 150 microlitros de cada mezcla de reacción a una placa de microtitulación. Se agregaron 75 microlitros de reactivo de parada y la absorbancia a 405 nm se midió en un espectrofotómetro de placa de microtitulación. Los resultados se resumen en la tabla 3 a continuación. Los números dados para cada temperatura son la actividad relativa (en %) normalizada al valor óptimo.

Tabla 3: Perfiles de temperatura relativa.

Variante de fitasa	Temperatura (°C)										
	20	30	40	50	60	65	70	75	80	85	90
Ec-phy01	19	33	53	81	100	86	23	14	12	10	7
Ec-phy06	15	28	45	70	89	100	89	21	14	11	9
Ec-phy07	18	34	54	82	100	83	18	13	11	10	7
Ec-phy08	14	25	38	61	82	100	38	13	10	9	7
Ec-phy09	10	19	33	54	69	95	99	100	16	10	6

**Ejemplo 5:** Perfil de pH.

[0228] El perfil de pH se determinó a 37 °C en el rango de pH de 2.0 a 7.5 (en pasos de 0.5 unidades de pH) como se describe anteriormente en la SEQción "Determinación de la actividad de la fitasa", excepto que se usó un cóctel de tampón (glicina 50 mM, ácido acético 50 mM y Bis-Tris 50 mM) en lugar del tampón de acetato de sodio 0.25 M a pH 5.5. Los resultados se resumen en la tabla 5 a continuación. Los valores dados para cada pH en el rango de 2.0 a 7.5 son la actividad relativa en % normalizada al valor óptimo.

Tabla 5: Perfiles de pH relativos a 37 °C

Mutación/pH	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5	5.5	6	6.5	7	7.5
Ec-phyt01	54	67	79	86	96	99	100	91	79	52	16	2

Mutación/pH	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5	5.5	6	6.5	7	7.5
Ec-phyt06	55	67	76	81	92	98	100	94	78	53	16	1
Ec-phyt07	57	72	83	88	98	99	100	89	72	46	14	2
Ec-phyt08	52	65	78	85	96	100	98	88	72	46	13	1
Ec-phyt09	59	71	82	93	96	100	92	77	59	35	9	0

**Ejemplo 6:** Rendimiento en piensos para animales en un modelo *in vitro*

5 [0229] El rendimiento en el pienso para animales de una serie de variantes de fitasa de la invención se compara en un modelo *in vitro* al rendimiento de una proteína de referencia como la SEQ ID n.º 2. El modelo *in vitro* simula las condiciones gastrointestinales en un animal monogástrico y se correlaciona bien con los resultados obtenidos en ensayos con animales *in vivo*. La versión utilizada en este ejemplo simula el buche y el estómago de un pollo de engorde. La comparación se realiza de la siguiente manera:  
10 La actividad de la fitasa en la muestra variante se determina como se describe en el ejemplo 1 en "Determinación de la actividad de la fitasa".

15 [0230] Los gránulos de pienso de un ensayo de alimentación de pollos de engorde, y con el maíz, la harina de soja y el aceite de soja como constituyentes principales, se preincuban a 40 °C y pH 4.6 durante 5 minutos, seguido de la adición de dosis adecuadas de las fitasas (se utilizan dosis idénticas para todas las fitasas que se van a ensayar para permitir la comparación), por ejemplo, entre 125 y 1000 unidades de fitasa FYT/kg de pienso, o tampón en las muestras de control. Después de 5 minutos de incubación, se agrega pepsina (3000 U/g de alimentación) en una solución de HCl y, de esta manera, el pH se reduce a 3. Las muestras se incuban luego a 40 °C durante otros 5 minutos. Las reacciones se detienen y el ácido fítico y los fosfatos de inositol se extraen mediante la adición de HCl hasta una concentración final de 0.5 M y la incubación a 40 °C durante 2 horas,  
20 seguida de un ciclo de congelación y descongelación y 1 hora de incubación a 40 °C.

25 [0231] El ácido fítico y los fosfatos de inositol se separan mediante cromatografía iónica de alto rendimiento como se describe en Chen et al en Journal of Chromatography A (2003) vol. 1018, págs. 41-52 y cuantificado según lo descrito por Skoglund et al en J. Agric. Food Chem. (1997), vol. 45, págs. 431-436. La degradación del fitato se calcula luego como la diferencia en el fósforo unido al inositol-6-fosfato (IP6-P) entre las muestras tratadas con fitasa y las no tratadas. El rendimiento relativo de la variante se calcula como el porcentaje de degradación del fitato por la fitasa de tipo salvaje.

30 **Ejemplo 7:** Rendimiento en un ensayo *in vivo* en cerdos

[0232] Evaluación comparativa de los efectos de cantidades graduadas de la fitasa de *E. coli* de tipo salvaje y una variante sobre la digestibilidad fecal y la excreción de fósforo y calcio en cerdos en crecimiento.

35 [0233] Se utilizan sesenta y cuatro cerdos blancos grandes × Landrace con un peso corporal inicial de 43.55 ± 4.35 kg. Los animales se alojan en jaulas con suelo en una habitación con control ambiental. Cada jaula tiene un suelo de alambre soldado revestido de plástico y está equipado con dos boquillas de agua y cuatro comederos individualizados de acero inoxidable. La temperatura ambiente era de 21-22 °C y el porcentaje de humedad era del 50 %.

40 [0234] Los cerdos se alimentan con una dieta basal formulada para proporcionar fósforo (P) exclusivamente de origen vegetal durante un período de adaptación de 14 días. Después de ese período se asignan en 16 grupos iguales de 4 animales cada uno.

45 [0235] Se alimentan durante 12 días de la dieta basal o de esta misma dieta suplementada con 1000 o 2000 U/kg de fitasa de *E. coli* de tipo salvaje o con 500, 1000 o 2000 U/kg de la variante designada 100 con 2 enlaces disulfuro adicionales.

50 [0236] Se añade un marcador indigestible (óxido de cromo) en una concentración de 0.4 % a todas las dietas, lo que permite el cálculo de la digestibilidad de P y calcio (Ca). El pienso se distribuye *ad libitum* en forma de puré, bajo el control del consumo de alimento de la jaula, y los animales tienen acceso libre al agua potable. La digestibilidad de Ca no se corrige para la ingesta de Ca con el agua potable.

55 [0237] Las concentraciones de P, Ca y Cr fecales se miden 12º día del segundo período. Las heces se muestrean individualmente, aproximadamente en la misma cantidad a la misma hora del día, durante los 3 días anteriores a esa fecha. Por lo tanto, para cada tratamiento dietético y para cada criterio se realizan un total de 12 determinaciones individuales. Todos los minerales se determinan de acuerdo con los métodos estándar de la

Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (1990) usando un espectrómetro Vista-MPX ICP-OES. La digestibilidad aparente (% de la ingesta) de los minerales se calcula para el período de 3 días mencionado.

LISTADO DE SECUENCIAS

5	[0238]		
	<110>	Novozymes A/S	
10	<120>	Variantes de fitasa termoestables	
	<130>	11540-WO-PCT	
	<150>	EP 10158031.4	
15	<151>	2010-03-26	
	<160>	6	
	<170>	versión de PatentIn 3.5	
20	<210>	1	
	<211>	1239	
	<212>	ADN	
	<213>	Escherichia coli	
25	<220>		
	<221>	CDS	
	<222>	(1)..(1239)	
30	<400>	1	
	cag agt gag ccg gag ctg aag ctg gaa agt gtg gtg att gtc agt cgt		48
	Gln Ser Glu Pro Glu Leu Lys Leu Glu Ser Val Val Ile Val Ser Arg		
	1 5 10 15		
35	cat ggt gtg cgt gct cca acc aag gcc acg caa ctg atg cag gat gtc		96
	His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Ala Thr Gln Leu Met Gln Asp Val		
	20 25 30		
40	acc cca gac gca tgg cca acc tgg ccg gta aaa ctg ggt tgg ctg aca		144
	Thr Pro Asp Ala Trp Pro Thr Trp Pro Val Lys Leu Gly Trp Leu Thr		
	35 40 45		
45	ccg cgc ggt ggt gag cta atc gcc tat ctc gga cat tac caa cgc cag		192
	Pro Arg Gly Gly Glu Leu Ile Ala Tyr Leu Gly His Tyr Gln Arg Gln		
	50 55 60		
50	cgt ctg gta gcc gac gga ttg ctg gcg aaa aag ggc tgc ccg cag tct		240
	Arg Leu Val Ala Asp Gly Leu Leu Ala Lys Lys Gly Cys Pro Gln Ser		
	65 70 75 80		
	ggt cag gtc gcg att att gct gat gtc gac gag cgt acc cgt aaa aca		288
	Gly Gln Val Ala Ile Ile Ala Asp Val Asp Glu Arg Thr Arg Lys Thr		
	85 90 95		
55	ggc gaa gcc ttc gcc gcc ggg ctg gca cct gac tgt gca ata acc gta		336
	Gly Glu Ala Phe Ala Ala Gly Leu Ala Pro Asp Cys Ala Ile Thr Val		
	100 105 110		
60	cat acc cag aca gat acg tcc agt ccc gat ccg tta ttt aat cct cta		384

ES 2 737 885 T3

	His	Thr	Gln	Thr	Asp	Thr	Ser	Ser	Pro	Asp	Pro	Leu	Phe	Asn	Pro	Leu	
			115					120					125				
5	aaa	act	ggc	ggt	tgc	caa	ctg	gat	aac	gcg	aac	gtg	act	gac	gcg	atc	432
	Lys	Thr	Gly	Val	Cys	Gln	Leu	Asp	Asn	Ala	Asn	Val	Thr	Asp	Ala	Ile	
		130					135					140					
10	ctc	agc	agg	gca	gga	ggg	tca	att	gct	gac	ttt	acc	ggg	cat	cgg	caa	480
	Leu	Ser	Arg	Ala	Gly	Gly	Ser	Ile	Ala	Asp	Phe	Thr	Gly	His	Arg	Gln	
	145					150					155					160	
15	acg	gcg	ttt	cgc	gaa	ctg	gaa	cgg	gtg	ctt	aat	ttt	ccg	caa	tca	aac	528
	Thr	Ala	Phe	Arg	Glu	Leu	Glu	Arg	Val	Leu	Asn	Phe	Pro	Gln	Ser	Asn	
					165					170					175		
20	ttg	tgc	ctt	aaa	cgt	gag	aaa	cag	gac	gaa	agc	tgt	tca	tta	acg	cag	576
	Leu	Cys	Leu	Lys	Arg	Glu	Lys	Gln	Asp	Glu	Ser	Cys	Ser	Leu	Thr	Gln	
				180					185						190		
25	gca	tta	cca	tcg	gaa	ctc	aag	gtg	agc	gcc	gac	aat	gtc	tca	tta	acc	624
	Ala	Leu	Pro	Ser	Glu	Leu	Lys	Val	Ser	Ala	Asp	Asn	Val	Ser	Leu	Thr	
								200					205				
30	ggt	gcg	gta	agc	ctc	gca	tca	atg	ctg	acg	gag	ata	ttt	ctc	ctg	caa	672
	Gly	Ala	Val	Ser	Leu	Ala	Ser	Met	Leu	Thr	Glu	Ile	Phe	Leu	Leu	Gln	
		210						215				220					
35	caa	gca	cag	gga	atg	ccg	gag	ccg	ggg	tgg	gga	agg	atc	acc	gat	tca	720
	Gln	Ala	Gln	Gly	Met	Pro	Glu	Pro	Gly	Trp	Gly	Arg	Ile	Thr	Asp	Ser	
	225					230					235					240	
40	cac	cag	tgg	aac	acc	ttg	cta	agt	ttg	cat	aac	gcg	caa	ttt	tat	ttg	768
	His	Gln	Trp	Asn	Thr	Leu	Leu	Ser	Leu	His	Asn	Ala	Gln	Phe	Tyr	Leu	
					245					250					255		
45	cta	caa	cgc	acg	cca	gag	ggt	gcc	cgc	agc	cgc	gcc	acc	ccg	tta	tta	816
	Leu	Gln	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Ala	Arg	Ser	Arg	Ala	Thr	Pro	Leu	Leu	
				260					265					270			
50	gat	ttg	atc	aag	aca	gcg	ttg	acg	ccc	cat	cca	ccg	caa	aaa	cag	gcg	864
	Asp	Leu	Ile	Lys	Thr	Ala	Leu	Thr	Pro	His	Pro	Pro	Gln	Lys	Gln	Ala	
				275				280					285				
55	tat	ggt	gtg	aca	tta	ccc	act	tca	gtg	ctg	ttt	atc	gcc	gga	cac	gat	912
	Tyr	Gly	Val	Thr	Leu	Pro	Thr	Ser	Val	Leu	Phe	Ile	Ala	Gly	His	Asp	
		290					295					300					
60	act	aat	ctg	gca	aat	ctc	ggc	ggc	gca	ctg	gag	ctc	aac	tgg	acg	ctt	960
	Thr	Asn	Leu	Ala	Asn	Leu	Gly	Gly	Ala	Leu	Glu	Leu	Asn	Trp	Thr	Leu	
		305				310					315				320		
65	ccc	ggt	cag	ccg	gat	aac	acg	ccg	cca	ggt	ggt	gaa	ctg	gtg	ttt	gaa	1008
	Pro	Gly	Gln	Pro	Asp	Asn	Thr	Pro	Pro	Gly	Gly	Glu	Leu	Val	Phe	Glu	
					325					330					335		
70	cgc	tgg	cgt	cgg	cta	agc	gat	aac	agc	cag	tgg	att	cag	ggt	tcg	ctg	1056
	Arg	Trp	Arg	Arg	Leu	Ser	Asp	Asn	Ser	Gln	Trp	Ile	Gln	Val	Ser	Leu	
				340					345					350			
75	gtc	ttc	cag	act	tta	cag	cag	atg	cgt	gat	aaa	acg	ccg	ctg	tca	tta	1104

ES 2 737 885 T3

Val Phe Gln Thr Leu Gln Gln Met Arg Asp Lys Thr Pro Leu Ser Leu  
 355 360 365

5 aat acg ccg ccc gga gag gtg aaa ctg acc ctg gca gga tgt gaa gag 1152  
 Asn Thr Pro Pro Gly Glu Val Lys Leu Thr Leu Ala Gly Cys Glu Glu  
 370 375 380

10 cga aat gcg cag ggc atg tgt tcg ttg gca ggt ttt acg caa atc gtg 1200  
 Arg Asn Ala Gln Gly Met Cys Ser Leu Ala Gly Phe Thr Gln Ile Val  
 385 390 395 400

15 aat gaa gca cgc ata ccg gcg tgc agt ttg cgt agt taa 1239  
 Asn Glu Ala Arg Ile Pro Ala Cys Ser Leu Arg Ser  
 405 410

20 <210> 2  
 <211> 412  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli  
 <400> 2

25 Gln Ser Glu Pro Glu Leu Lys Leu Glu Ser Val Val Ile Val Ser Arg  
 1 5 10 15

30 His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Ala Thr Gln Leu Met Gln Asp Val  
 20 25 30

35 Thr Pro Asp Ala Trp Pro Thr Trp Pro Val Lys Leu Gly Trp Leu Thr  
 35 40 45

40 Pro Arg Gly Gly Glu Leu Ile Ala Tyr Leu Gly His Tyr Gln Arg Gln  
 50 55 60

45 Arg Leu Val Ala Asp Gly Leu Leu Ala Lys Lys Gly Cys Pro Gln Ser  
 65 70 75 80

50 Gly Gln Val Ala Ile Ile Ala Asp Val Asp Glu Arg Thr Arg Lys Thr  
 85 90 95

55 Gly Glu Ala Phe Ala Ala Gly Leu Ala Pro Asp Cys Ala Ile Thr Val  
 100 105 110

60 His Thr Gln Thr Asp Thr Ser Ser Pro Asp Pro Leu Phe Asn Pro Leu  
 115 120 125

65 Lys Thr Gly Val Cys Gln Leu Asp Asn Ala Asn Val Thr Asp Ala Ile  
 130 135 140

60 Leu Ser Arg Ala Gly Gly Ser Ile Ala Asp Phe Thr Gly His Arg Gln

ES 2 737 885 T3

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



ES 2 737 885 T3

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

ES 2 737 885 T3

405

410

5 <210> 4  
 <211> 412  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli  
  
 10 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (1)..(412)  
 <223> Variante Nov9X de WO 2009/073399  
  
 15 <400> 4  
  
 Met Ala Gln Ser Glu Pro Glu Leu Lys Leu Glu Ser Val Val Ile Val  
 1 5 10 15  
  
 20 Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Ala Thr Gln Leu Met Gln  
 20 25 30  
  
 25 Asp Val Thr Pro Asp Ala Trp Pro Thr Trp Pro Val Lys Leu Gly Glu  
 35 40 45  
  
 30 Leu Thr Pro Arg Gly Gly Glu Leu Ile Ala Tyr Leu Gly His Tyr Trp  
 50 55 60  
  
 35 Arg Gln Arg Leu Val Ala Asp Gly Leu Leu Pro Lys Cys Gly Cys Pro  
 65 70 75 80  
  
 40 Gln Ser Gly Gln Val Ala Ile Ile Ala Asp Val Asp Glu Arg Thr Arg  
 85 90 95  
  
 45 Lys Thr Gly Glu Ala Phe Ala Ala Gly Leu Ala Pro Asp Cys Ala Ile  
 100 105 110  
  
 50 Thr Val His Thr Gln Ala Asp Thr Ser Ser Pro Asp Pro Leu Phe Asn  
 115 120 125  
  
 55 Pro Leu Lys Thr Gly Val Cys Gln Leu Asp Asn Ala Asn Val Thr Asp  
 130 135 140  
  
 Ala Ile Leu Glu Arg Ala Gly Gly Ser Ile Ala Asp Phe Thr Gly His  
 145 150 155 160  
  
 60 Tyr Gln Thr Ala Phe Arg Glu Leu Glu Arg Val Leu Asn Phe Pro Gln  
 165 170 175

ES 2 737 885 T3

Ser Asn Leu Cys Leu Lys Arg Glu Lys Gln Asp Glu Ser Cys Ser Leu  
180 185 190

5 Thr Gln Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Val Ser Ala Asp Cys Val Ser  
195 200 205

10 Leu Thr Gly Ala Val Ser Leu Ala Ser Met Leu Thr Glu Ile Phe Leu  
210 215 220

15 Leu Gln Gln Ala Gln Gly Met Pro Glu Pro Gly Trp Gly Arg Ile Thr  
225 230 235 240

20 Asp Ser His Gln Trp Asn Thr Leu Leu Ser Leu His Asn Ala Gln Phe  
245 250 255

25 Asp Leu Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser Arg Ala Thr Pro  
260 265 270

30 Leu Leu Asp Leu Ile Lys Thr Ala Leu Thr Pro His Pro Pro Gln Lys  
275 280 285

35 Gln Ala Tyr Gly Val Thr Leu Pro Thr Ser Val Leu Phe Ile Ala Gly  
290 295 300

40 His Asp Thr Asn Leu Ala Asn Leu Gly Gly Ala Leu Glu Leu Asn Trp  
305 310 315 320

45 Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly Gly Glu Leu Val  
325 330 335

50 Phe Glu Arg Trp Arg Arg Leu Ser Asp Asn Ser Gln Trp Ile Gln Val  
340 345 350

55 Ser Leu Val Phe Gln Thr Leu Gln Gln Met Arg Asp Lys Thr Pro Leu  
355 360 365

60 Ser Leu Asn Thr Pro Pro Gly Glu Val Lys Leu Thr Leu Ala Gly Cys  
370 375 380

Glu Glu Arg Asn Ala Gln Gly Met Cys Ser Leu Ala Gly Phe Thr Gln  
385 390 395 400

Ile Val Asn Glu Ala Arg Ile Pro Ala Cys Ser Leu  
405 410

ES 2 737 885 T3

```

<210> 5
<211> 432
<212> PRT
<213> Escherichia coli
5

<220>
<221> PROPEP
<222> (1)..(22)
10

<220>
<221> mat_peptide
<222> (23)..(432)
15

<400> 5

Met Lys Ala Ile Leu Ile Pro Phe Leu Ser Leu Leu Ile Pro Leu Thr
      -20                -15                -10

20

Pro Gln Ser Ala Phe Ala Gln Ser Glu Pro Glu Leu Lys Leu Glu Ser
  -5                -1  1                5                10

25

Val Val Ile Val Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Ala Thr
      15                20                25

30

Gln Leu Met Gln Asp Val Thr Pro Asp Ala Trp Pro Thr Trp Pro Val
      30                35                40

35

Lys Leu Gly Glu Leu Thr Pro Arg Gly Gly Glu Leu Ile Ala Tyr Leu
      45                50                55

40

Gly His Tyr Trp Arg Gln Arg Leu Val Ala Asp Gly Leu Leu Pro Lys
      60                65                70

45

Cys Gly Cys Pro Gln Ser Gly Gln Val Ala Ile Ile Ala Asp Val Asp
      75                80                85                90

50

Glu Arg Thr Arg Lys Thr Gly Glu Ala Phe Ala Ala Gly Leu Ala Pro
      95                100                105

55

Asp Cys Ala Ile Thr Val His Thr Gln Ala Asp Thr Ser Ser Pro Asp
      110                115                120

60

Pro Leu Phe Asn Pro Leu Lys Thr Gly Val Cys Gln Leu Asp Asn Ala
      125                130                135

65

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

```

ES 2 737 885 T3

Phe Thr Gly His Tyr Gln Thr Ala Phe Arg Glu Leu Glu Arg Val Leu  
 155 160 165 170

5 Asn Phe Pro Gln Ser Asn Leu Cys Leu Lys Arg Glu Lys Gln Asp Glu  
 175 180 185

10 Ser Cys Ser Leu Thr Gln Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Val Ser Ala  
 190 195 200

15 Asp Cys Val Ser Leu Thr Gly Ala Val Ser Leu Ala Ser Met Leu Thr  
 205 210 215

20 Glu Ile Phe Leu Leu Gln Gln Ala Gln Gly Met Pro Glu Pro Gly Trp  
 220 225 230

25 Gly Arg Ile Thr Asp Ser His Gln Trp Asn Thr Leu Leu Ser Leu His  
 235 240 245 250

30 Asn Ala Gln Phe Asp Leu Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser  
 255 260 265

35 Arg Ala Thr Pro Leu Leu Asp Leu Ile Lys Thr Ala Leu Thr Pro His  
 270 275 280

40 Pro Pro Gln Lys Gln Ala Tyr Gly Val Thr Leu Pro Thr Ser Val Leu  
 285 290 295

45 Phe Ile Ala Gly His Asp Thr Asn Leu Ala Asn Leu Gly Gly Ala Leu  
 300 305 310

50 Glu Leu Asn Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly  
 315 320 325 330

55 Gly Glu Leu Val Phe Glu Arg Trp Arg Arg Leu Ser Asp Asn Ser Gln  
 335 340 345

60 Trp Ile Gln Val Ser Leu Val Phe Gln Thr Leu Gln Gln Met Arg Asp  
 350 355 360

Lys Thr Pro Leu Ser Leu Asn Thr Pro Pro Gly Glu Val Lys Leu Thr  
 365 370 375

Leu Ala Gly Cys Glu Glu Arg Asn Ala Gln Gly Met Cys Ser Leu Ala  
 380 385 390

ES 2 737 885 T3

Gly Phe Thr Gln Ile Val Asn Glu Ala Arg Ile Pro Ala Cys Ser Leu  
 395 400 405 410

5 <210> 6  
 <211> 432  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli

10 <220>  
 <221> PROPEP  
 <222> (1)..(22)

15 <220>  
 <221> mat\_peptide  
 <222> (23)..(432)

<400> 6

20 Met Lys Ala Ile Leu Ile Pro Phe Leu Ser Leu Leu Ile Pro Leu Thr  
 -20 -15 -10

25 Pro Gln Ser Ala Phe Ala Gln Ser Glu Pro Glu Leu Lys Leu Glu Ser  
 -5 -1 1 5 10

30 Val Val Ile Val Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Ala Thr  
 15 20 25

35 Gln Leu Met Gln Asp Val Thr Pro Asp Ala Trp Pro Thr Trp Pro Val  
 30 35 40

Lys Leu Gly Trp Leu Thr Pro Arg Gly Gly Glu Leu Ile Ala Tyr Leu  
 45 50 55

40 Gly His Tyr Gln Arg Gln Arg Leu Val Ala Asp Gly Leu Leu Ala Lys  
 60 65 70

45 Lys Gly Cys Pro Gln Ser Gly Gln Val Ala Ile Ile Ala Asp Val Asp  
 75 80 85 90

50 Glu Arg Thr Arg Lys Thr Gly Glu Ala Phe Ala Ala Gly Leu Ala Pro  
 95 100 105

55 Asp Cys Ala Ile Thr Val His Thr Gln Ala Asp Thr Ser Ser Pro Asp  
 110 115 120

Pro Leu Phe Asn Pro Leu Lys Thr Gly Val Cys Gln Leu Asp Asn Ala  
 125 130 135

60

ES 2 737 885 T3

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

5 Phe Thr Gly His Arg Gln Thr Ala Phe Arg Glu Leu Glu Arg Val Leu  
 155 160 165 170

10 Asn Phe Pro Gln Ser Asn Leu Cys Leu Lys Arg Glu Lys Gln Asp Glu  
 175 180 185

15 Ser Cys Ser Leu Thr Gln Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys Val Ser Ala  
 190 195 200

20 Asp Asn Val Ser Leu Thr Gly Ala Val Ser Leu Ala Ser Met Leu Thr  
 205 210 215

Glu Ile Phe Leu Leu Gln Gln Ala Gln Gly Met Pro Glu Pro Gly Trp  
 220 225 230

25 Gly Arg Ile Thr Asp Ser His Gln Trp Asn Thr Leu Leu Ser Leu His  
 235 240 245 250

30 Asn Ala Gln Phe Tyr Leu Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser  
 255 260 265

35 Arg Ala Thr Pro Leu Leu Asp Leu Ile Lys Thr Ala Leu Thr Pro His  
 270 275 280

40 Pro Pro Gln Lys Gln Ala Tyr Gly Val Thr Leu Pro Thr Ser Val Leu  
 285 290 295

Phe Ile Ala Gly His Asp Thr Asn Leu Ala Asn Leu Gly Gly Ala Leu  
 300 305 310

45 Glu Leu Asn Trp Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Thr Pro Pro Gly  
 315 320 325 330

50 Gly Glu Leu Val Phe Glu Arg Trp Arg Arg Leu Ser Asp Asn Ser Gln  
 335 340 345

55 Trp Ile Gln Val Ser Leu Val Phe Gln Thr Leu Gln Gln Met Arg Asp  
 350 355 360

Lys Thr Pro Leu Ser Leu Asn Thr Pro Pro Gly Glu Val Lys Leu Thr  
 365 370 375

60

ES 2 737 885 T3

Leu Ala Gly Cys Glu Glu Arg Asn Ala Gln Gly Met Cys Ser Leu Ala  
380 385 390

5 Gly Phe Thr Gln Ile Val Asn Glu Ala Arg Ile Pro Ala Cys Ser Leu  
395 400 405 410

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Variante de fitasa que tiene al menos un 85 % de identidad con la SEQ ID n.º 2 y que comprende al menos un puente disulfuro en comparación con la SEQ ID n.º 2, en la que dicho(s) puente(s) disulfuro no se encuentra(n) entre los cuatro de origen natural en las posiciones 77/108, 133/408, 178/188 y 382/391 con la numeración que se proporciona en la SEQ ID n.º 2, en la que al menos un puente disulfuro es el par de posición: A) 52C/99C, y en la que la variante de fitasa es más termoestable que la fitasa de referencia.
- 10 2. Variante de fitasa según la reivindicación 1, en la que el número de puentes disulfuro establecidos es dos utilizando las siguientes combinaciones de pares de posiciones:  
A + B, A + C, A + D, A + E, A + F y A + G, donde A significa 52C/99C, B significa 141C/200C, C significa 31C/177C, D significa 91C/46C, E significa 31C/176C, F significa 59C/100C y G significa 162C/248C.
- 15 3. Variante de fitasa según la reivindicación 1, en la que el número de puentes disulfuro establecidos es tres utilizando las siguientes combinaciones de pares de posiciones:  
A + B + C, A + B + D, A + B + E, A + B + F, A + B + G, A + C + D, A + C + E, A + C + F, A + C + G, A + D + E, A + D + F, A + D + G, A + E + F, A + E + G y A + F + G, donde A significa 52C/99C, B significa 141C/200C, C significa 31C/177C, D significa 91C/46C, E significa 31C/176C, F significa 59C/100C, y G significa 162C/248C.
- 20 4. Variante de fitasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además una modificación en al menos una posición seleccionada de entre las siguientes: 25, 37, 38, 75, 77, 108, 114, 123, 126, 127, 133, 137, 141, 142, 146, 157, 173, 178, 188, 204, 211, 233, 235, 253, 267, 286, 287, 317, 318, 327, 367, 382, 391 y 408.
- 25 5. Variante de fitasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende una modificación adicional seleccionada de entre las siguientes:  
A25F, W37F, P38Y, C75K, C75V, C75E, C77A, C108A, T114H, P123E, N126Y, P127L, P127V, C133A, N137E, N137V, T141R, D142R, E146R, G157R, P173Y, C178A, C188A, C204N, C204D, V211W, G233E, G235Y, Q253V, R267A, K286F, Q287Y, N317L, W318Y, T327Y, S367F, C382A, C391A, C408A, y/o de las siguientes combinaciones W37F/P38Y, P123E/P127L, N126Y/P127V, G233E/G235Y, K286F/Q287Y, N317L/W318Y, W37F/P38Y/P123E/P127L, W37F/P38Y/N126Y/P127V, P173Y/N317L/W318Y, C75K/C204N, 75K/C204N/C382A/C391A, C75K/C204N/C178A/C188A/C382A/C391A, C75K/C204N/C178A/C188A, C75K/C204N/C382A/C391A, C75K/C204N/C77A/C108A, C75K/C204N/C133A/C108A, A25F/C75V/T114H/N137E/T141R/E146R/G157R/C204D/V211W/Q253V/R267A/T327Y/C178A/C188A, A25F/C75V/T114H/N137E/T141R/E146R/G157R/C204D/V211W/Q253V/R267A/T327Y/C382A/C391A, A25F/C75V/T114H/N137E/T141R/E146R/G157R/C204D/V211W/Q253V/R267A/T327Y/C178A/C188A/C382A/C391A,
- 30 A25F/C75V/T114H/N137E/T141R/E146R/G157R/C204DA/211W/Q253V/R267A/T327Y/C77A/C108A, A25F/C75V/T114H/N137E/T141R/E146R/G157R/C204D/V211W/Q253V/R267A/T327Y/ C133A/C408A, A25F/C75E/T114H/N137V/G157R/C204D/V211W/Q253V/R267A/T327Y, A25F/C75E/N137V/T141R/D142R/G157R/C204D/V211W/Q253V/T327Y, A25F/T114H/N137V/T141R/D142R/G157R/C204D/V211W/Q253V/T327Y, A25F/T114H/N137V/T141R/D142R/E146R/G157R/C204D/V211W/Q253V/R267A/T327Y, A25F/C75V/T114H/N137V/T141R/E146R/G157R/C204D/V211W/Q253V/R267A/T327Y, A25F/C75V/T114H/N137V/T141R/D142R/E146R/G157R/C204D/V211W/Q253V/T327Y, A25F/T114H/N137V/T141R/D142R/E146R/G157R/C204D/V211W/Q253V/T327Y, A25F/C75E/T114H/N137V/T141R/D142R/E146R/G157R/V211W/Q253V/R267A/T327Y, A25F/C75E/T114H/N137E/T141R/D142R/G157R/V211W/Q253V/R267A/T327Y/L341P, A47F/C97V/T136H/N159V/T163R/D164R/G179R/V233W/Q275V/R289A/T349Y, A25F/C75E/T114H/N137V/T141R/D142R/E146R/G157R/C204D/V211W/Q253V/R267A/T327Y, A25F/C75E/N137V/D142R/G157R/C204D/V211W/Q253V/R267A/T327Y, A25F/C75E/N137E/T141R/D142R/E146R/G157R/C204D/V211W/Q253V/R267A/T327Y, A25F/C75V/T114H/N137E/T141R/D142R/E146R/G157R/C204D/V211W/Q253V/R267A/T327Y, A25F/C75E/T114H/N137V/T141R/G157R/C204D/V211W/Q253V/T327Y, A25F/C75E/T114H/N137V/T141R/D142R/E146R/G157R/C204D/V211W/Q253V/T327Y, A25F/T114H/N137E/T141R/D142R/G157R/C204D/V211W/Q253V/R267A/T327Y, A25F/T114H/N137V/D142R/G157R/C204D/V211W/Q253V/T327Y, A25F/C75V/T114H/N137V/D142R/G157R/C204D/V211W/Q253V/T327Y, A25F/C75V/T114H/N137V/D142R/G157R/V211W/Q253V/T327Y y A25F/T114H/N137V/C204D/V211W/T327Y.
- 35 40 45 50 55 60 65

- 5 6. Método para preparar la variante de fitasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende establecer al menos un puente disulfuro en comparación con la SEQ ID n.º 2, en la que dicho(s) puente(s) disulfuro no está(n) entre los cuatro de origen natural en las posiciones 77/108, 133/408, 178/188 y 382/391 con la numeración que se proporciona en la SEQ ID n.º 2, y en la que dicho(s) puente(s) disulfuro se establece(n) en el par de posiciones: A) 52C/99C.
- 10 7. Método según la reivindicación 6, en el que la parte madura de la fitasa de la SEQ ID n.º 2, la SEQ ID n.º 3, la SEQ ID n.º 4, la SEQ ID n.º 5 o la SEQ ID n.º 6 se usa como progenitor/esqueleto para producir la variante de fitasa.
- 15 8. Polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la variante de fitasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 20 9. Constructo de ácidos nucleicos que comprende el polinucleótido de la reivindicación 8 operativamente enlazado a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un huésped de expresión.
- 25 10. Vector de expresión recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos según la reivindicación 9.
- 30 11. Célula huésped recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos según la reivindicación 9 y/o el vector de expresión según la reivindicación 10.
- 35 12. Método para producir la variante de fitasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende
- (a) cultivar la célula huésped según la reivindicación 11 para producir un sobrenadante que comprende la fitasa; y
  - (b) recuperar la fitasa.
- 40 13. Composición que comprende al menos una variante de fitasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 45 14. Composición según la reivindicación 13, que comprende además
- (a) al menos una vitamina liposoluble;
  - (b) al menos una vitamina hidrosoluble; y/o
  - (c) al menos un oligoelemento.
- 50 15. Composición según la reivindicación 14, que comprende además al menos una enzima seleccionada del siguiente grupo de enzimas: amilasa, fitasa, fosfatasa, xilanasas, galactanasas, alfa-galactosidasas, proteasa, fosfolipasa y/o beta-glucanasa.
16. Uso de la variante de fitasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o la composición según cualquiera de las reivindicaciones 14-15 en piensos para animales; en la preparación de piensos; para mejorar el valor nutricional del pienso para animales; para reducir los niveles de fitato en el estiércol; para el tratamiento de proteínas vegetales; o para liberar fósforo de un sustrato de fitasa.
17. Método para generar un producto de fermentación que comprende fermentar un material de carbohidratos en presencia de la variante de fitasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
18. Método para generar etanol que comprende fermentar un material de carbohidratos en presencia de la variante de fitasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y producir etanol.



		130	140	150	160	170
SEQ ID NO:2		9012345678	9012345678	9012345678	9012345678	9012345678
SEQ ID NO:3 (S)		KTGVCQLDNA	NVTDAILSRA	GGSIADFTGH	RQTAFRELER	VLNFPQSNLC
SEQ ID NO:4 (Nov9X)		KTGVCQLDNA	NVTDAILSRA	GGSIADFTGH	RQTAFRELER	VLNFPQSNLC
SEQ ID NO 5 (V2)		KTGVCQLDNA	NVTDAILERA	GGSIADFTGH	YQTAFRELER	VLNFPQSNLC
SEQ ID NO:6 (V4)		KTGVCQLDNA	NVTDAILSRA	GGSIADFTGH	RQTAFRELER	VLNFPQSNLC
		180	190	200	210	220
SEQ ID NO:2		9012345678	9012345678	9012345678	9012345678	9012345678
SEQ ID NO:3 (S)		LKREKQDESC	SLTQALPSEL	KVSADNVSLT	GAVSLASMLT	EIFLLQQAQG
SEQ ID NO:4 (Nov9X)		LKREKQDESC	SLTQALPSEL	KVSADNVSLT	GAVSLASMLT	EIFLLQQAQG
SEQ ID NO 5 (V2)		LKREKQDESC	SLTQALPSEL	KVSADCVSLT	GAVSLASMLT	EIFLLQQAQG
SEQ ID NO:6 (V4)		LKREKQDESC	SLTQALPSEL	KVSADNVSLT	GAVSLASMLT	EIFLLQQAQG
		230	240	250	260	270
SEQ ID NO:2		9012345678	9012345678	9012345678	9012345678	9012345678
SEQ ID NO:3 (S)		MPEPGWGRIT	DSHQWNTLLS	LHNAQFYLLQ	RTPEVARARA	TPLLDLIMAA
SEQ ID NO:4 (Nov9X)		MPEPGWGRIT	DSHQWNTLLS	LHNAQFYLLQ	RTPEVARARA	TPLLDLIKTA
SEQ ID NO 5 (V2)		MPEPGWGRIT	DSHQWNTLLS	LHNAQFDLLQ	RTPEVARARA	TPLLDLIKTA
SEQ ID NO:6 (V4)		MPEPGWGRIT	DSHQWNTLLS	LHNAQFYLLQ	RTPEVARARA	TPLLDLIKTA

Fig. 1

	280	290	300	310	320
SEQ ID NO:2	9012345678	9012345678	9012345678	9012345678	9012345678
SEQ ID NO:3 (S)	LTPHPPQKQA	YGVTLPTSVL	FIAGHTNLA	NLGGALELNW	TLPGQPDNTP
SEQ ID NO:4 (Nov9X)	LTPHPPQKQA	YGVTLPTSVL	FIAGHTNLA	NLGGALELNW	TLPGQPDNTP
SEQ ID NO 5 (V2)	LTPHPPQKQA	YGVTLPTSVL	FIAGHTNLA	NLGGALELNW	TLPGQPDNTP
SEQ ID NO:6 (V4)	LTPHPPQKQA	YGVTLPTSVL	FIAGHTNLA	NLGGALELNW	TLPGQPDNTP
	330	340	350	360	370
SEQ ID NO:2	9012345678	9012345678	9012345678	9012345678	9012345678
SEQ ID NO:3 (S)	PGGELVFERW	RRLSDNSQWI	QVSLVFQTLQ	QMRDKTPLSL	NTPPGEVKLT
SEQ ID NO:4 (Nov9X)	PGGELVFERW	RRLSDNSQWI	QVSLVFQTLQ	QMRDKTPLSL	NTPPGEVKLT
SEQ ID NO 5 (V2)	PGGELVFERW	RRLSDNSQWI	QVSLVFQTLQ	QMRDKTPLSL	NTPPGEVKLT
SEQ ID NO:6 (V4)	PGGELVFERW	RRLSDNSQWI	QVSLVFQTLQ	QMRDKTPLSL	NTPPGEVKLT
	380	390	400	410	420
SEQ ID NO:2	9012345678	9012345678	9012345678	9012345678	9012345678
SEQ ID NO:3 (S)	LAGCEERNAQ	GMCSLAGFTQ	IVNEARIPAC	SLRS	
SEQ ID NO:4 (Nov9X)	LAGCEERNAQ	GMCSLAGFTQ	IVNEARIPAC	SL..	
SEQ ID NO 5 (V2)	LAGCEERNAQ	GMCSLAGFTQ	IVNEARIPAC	SL..	
SEQ ID NO:6 (V4)	LAGCEERNAQ	GMCSLAGFTQ	IVNEARIPAC	SL..	

Fig. 1