



(19) OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 328 670**

(51) Int. Cl.:

C12N 9/16 (2006.01)	C12N 15/01 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)	A23K 1/165 (2006.01)
A23L 1/015 (2006.01)	A23L 1/03 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/29 (2006.01)
C12N 15/55 (2006.01)	C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/79 (2006.01)	C12N 5/10 (2006.01)
C12N 5/14 (2006.01)	A01H 5/00 (2006.01)
A23K 1/00 (2006.01)	A23K 1/18 (2006.01)
A23K 1/20 (2006.01)	A23L 1/30 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **01937752 .2**

(96) Fecha de presentación : **24.05.2001**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1301592**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **16.04.2003**

(54) Título: **Fitasas bacterianas recombinantes y su utilización.**

(30) Prioridad: **25.05.2000 US 580515**

(73) Titular/es: **Verenium Corporation**
4955 Directors Place
San Diego, California 92121, US

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.11.2009

(72) Inventor/es: **Short, Jay M.;**
Gray, Kevin, A.;
Barton, Nelson, Robert;
Garrett, James, B.;
O'Donoghue, Eileen;
Mathur Eric J. y
Robertson, Dan

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.11.2009

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

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

Fitasas bacterianas recombinantes y su utilización.

5 Esta invención se refiere a polinucleótidos recién identificados, polipéptidos codificados por tales polinucleótidos, el uso de tales polinucleótidos y polipéptidos, así como la producción y el aislamiento de tales polinucleótidos y polipéptidos. Más concretamente, los polipéptidos de la presente invención han sido identificados como enzimas que tienen actividad fitasa.

10 Antecedentes de la invención

Los minerales son elementos esenciales para el crecimiento de todos los organismos. Los minerales de la dieta pueden derivar de muchos materiales de origen, incluyendo plantas. Por ej., las semillas de plantas son una fuente rica de minerales puesto que contienen iones que forman complejo con los grupos fosfato de las moléculas de ácido fítico. 15 Estos minerales asociados a fitato satisfacen las necesidades dietéticas de algunas especies de organismos criados en granja, tales como los rumiantes provistos de estómago múltiple. Por lo tanto, los rumiantes no requieren suplementación dietética con fosfato inorgánico y minerales puesto que los microorganismos en el rumen producen enzimas que catalizan la conversión de fitato (mio-inositol-hexafosfato) a inositol y fosfato inorgánico. En el procedimiento, se liberan los minerales que han formado complejo con el fitato. La mayoría de las especies de organismos criados 20 en granja, no obstante, son incapaces de utilizar eficazmente los minerales asociados con el fitato. De este modo, por ejemplo, en la producción de ganado de animales monogástricos (p. ej., cerdos, aves, y peces), el alimento está complementado comúnmente con minerales y/o con sustancias antibióticas que alteran el entorno de la flora digestiva del organismo que lo consume aumentando las tasas de crecimiento.

25 Por lo que se refiere a esto, existen muchas cargas problemáticas -relacionadas con la nutrición, las etapas de procesamiento *ex vivo*, la salud y la medicina, la conservación medioambiental, y la gestión de recursos- que están asociadas a una hidrólisis insuficiente de fitato en muchas aplicaciones. Los siguientes son ejemplos no limitantes de estos problemas:

- 30 1. 1) La suplementación de dietas con minerales inorgánicos es un gasto costoso.
- 2. 2) La presencia de fitato no hidrolizado es indeseable y problemática en muchas de las aplicaciones *ex vivo* (p. ej. ocasionando la presencia de un sedimento no deseado).
- 35 3. 3) La complementación de dietas con antibióticos posee un tratamiento médico para seres humanos y animales parecido aumentando la abundancia de patógenos tolerantes a los antibióticos.
- 4. 4) La descarga de minerales fecales no absorbidos al medio ambiente desorganiza y daña los ecosistemas de los suelos circundantes, las aguas de las piscifactorías, y las aguas superficiales en general.
- 40 5. 5) Los valiosos ofrecimientos nutricionales de muchos productos alimenticios potenciales permanecen significativamente sin explotar y desaprovechados.

Muchas plantas potencialmente nutritivas, incluyendo particularmente sus semillas, contienen cantidades apreciables de nutrientes, p. ej. fosfato, que están asociados con fitato de una manera tal que estos nutrientes no están disponibles libremente tras su consumo. La disponibilidad de estos nutrientes es superada por algunos organismos, incluyendo vacas y otros rumiantes, que tienen una capacidad digestiva suficiente -transformada en gran parte por la presencia de formas de vida simbióticas en sus tractos digestivos- para hidrolizar fitato y liberar los nutrientes asociados. Sin embargo, la mayoría de especies de animales criados en granja, incluyendo cerdos, peces, pollos, pavos, así 50 como otros organismos no rumiantes incluidos el hombre, son incapaces de liberar eficazmente estos nutrientes tras la ingestión.

Por consiguiente, los productos alimenticios que contienen fitato requieren un suplemento de nutrientes exógenos y/o una fuente de actividad fitasa con el fin de corregir sus deficientes ofrecimientos nutricionales tras su consumo por 55 un gran número de especies de organismos.

En otro aspecto más, la presencia de fitato no hidrolizado conduce a consecuencias problemáticas en los procesos *ex vivo* incluyendo -pero no limitados a- el tratamiento de productos alimenticios. Pero solamente en una exemplificación, como se describe en EP0321004-B1 (Vaara *et al.*), hay una etapa en el tratamiento de los granos de maíz y sorgo por medio de la cual los granos duros maceran en agua para reblanecerlos. Las sustancias solubles en agua que lixivian durante este procedimiento pasan a formar parte de unas aguas de infusión de maíz, que se concentran mediante evaporación. El ácido fítico no hidrolizado en las aguas de infusión de maíz, en gran parte en forma de sales de calcio y magnesio, está asociado con fósforo y deposita un sedimento no deseable con proteínas e iones metálicos. Este sedimento es problemático en la evaporación, el transporte y el almacenamiento de las aguas de infusión de maíz. Por lo tanto, las moléculas de fitasa descritas en la presente memoria -solas o combinadas con otros reactivos (incluyendo pero no limitados a enzimas, incluyendo proteasas)- son útiles no sólo en esta aplicación (p. ej., para la prevención del sedimento no deseado) sino también en otras aplicaciones en las que es deseable la hidrólisis de fitato.

La suplementación de dietas con sustancias antibióticas tiene muchos resultados beneficiosos en la producción de ganado. Por ejemplo, además de su papel como medio profiláctico para prevenir la enfermedad, se ha demostrado que la administración de antibióticos exógenos aumenta las tasas de crecimiento en más de 3-5%. El mecanismo de esta acción puede implicar también -en parte- una alteración en el entorno de la flora digestiva de los animales criados en granja, dando como resultado un equilibrio de la microflora que es mucho mejor para la absorción de nutrientes.

Sin embargo, un efecto significativamente negativo asociado con el uso excesivo de antibióticos es el riesgo de crear un depósito de cepas microbianas patógenas resistentes a antibióticos. El riesgo es inminente, y la aparición de patógenos resistentes a los fármacos en seres humanos ya se ha ligado al uso de antibióticos en el ganado. Por ejemplo, 10 la Avoparcina, el antibiótico utilizado en alimentos para animales, fue prohibida en muchos lugares en 1997, y a los animales se les está suministrando ahora otro antibiótico, la virginiamicina, que es muy similar al nuevo fármaco, la Sinercida, utilizada para remplazar la vancomicina en seres humanos. Sin embargo, los estudios ya han demostrado que algunos enterococos de animales criados en granja son resistentes a la Sinercida. Por consiguiente, es probable que vuelvan a producirse las consecuencias de tolerancia no deseadas, tales como las que ya se han observado con la 15 Avoparcina y la vancomicina, no importando que se utilicen nuevos antibióticos como agentes profilácticos globales para los animales criados en granja. Por lo tanto, los investigadores están exigiendo controles más estrictos sobre el uso de fármacos en la industria.

Los aumentos en las tasas de crecimiento logrados en animales criados con productos alimenticios complementados con las de moléculas de fitasa descritas en la presente memoria coinciden -si no sobrepasan- los logrados utilizando antibióticos tales como, por ejemplo, Avoparcina. Por lo tanto, las moléculas de fitasa descritas en la presente memoria -solas o combinadas con otros reactivos (incluyendo pero no limitados a enzimas, incluyendo proteasas)- son útiles no sólo en esta aplicación (p. ej., para aumentar la tasa de crecimiento de animales criados en granja) sino también en otras aplicaciones en las que es deseable la hidrólisis de fitato.

Una consecuencia medioambiental es que el consumo de los productos alimenticios que contienen fitato por cualquier especie de organismo que es deficiente en fitasa -con independencia de si los productos alimenticios están complementados con minerales- conduce a contaminación fecal resultante de la excreción de minerales no absorbidos. Esta contaminación tiene un impacto negativo no sólo sobre el hábitat inmediato sino también por consiguiente sobre las aguas circundantes. Las alteraciones medioambientales se producen principalmente al final de la cadena alimentaria, y por lo tanto tienen el potencial de penetrar hacia arriba y por todas partes un ecosistema efectuando un daño permanente y catastrófico -particularmente después de años de continua contaminación. Este problema tiene el potencial de automanifestarse en cualquier área en la que se produzca la transformación concentrada de fitato- incluyendo las etapas de transformación *in vivo* (p. ej. por animales en áreas de producción de ganado, terrenos zoológicos, refugios de vida salvaje, etc.) e *in vitro* (p. ej. en la moliuración en mojado de maíz comercial, procedimientos de maceración de cereales, etc.).

La decisión de utilizar moléculas de fitasa añadidas exógenamente -ya sea para su remplazo completo o para aumentar el uso de minerales y/o antibióticos administrados exógenamente- necesita por último pasar una prueba de viabilidad financiera y eficacia de costes por el usuario cuya forma de vida depende de la aplicación relevante, tal como la producción de ganado.

Por consiguiente, existe la necesidad de medios para lograr la hidrólisis eficaz y rentable de fitato en diferentes aplicaciones. Particularmente, existe la necesidad de métodos para optimizar la hidrólisis de fitato en aplicaciones comerciales. En un aspecto concreto, existe la necesidad de optimizar los métodos de tratamiento comerciales que mejoran los ofrecimientos nutricionales de los productos alimenticios que contienen fitato para su consumo por seres humanos y animales criados en granja.

Están disponibles informes previos de fitasas recombinantes, pero sus inferiores actividades son eclipsadas por las moléculas de fitasa recién descubiertas de la presente invención. Por lo tanto, se espera que las moléculas de fitasa descritas en la presente memoria proporcionen un funcionamiento comercial sustancialmente superior al de las moléculas de fitasa identificadas previamente, p. ej. moléculas de fitasa de origen fúngico.

El fitato se produce como una fuente de fósforo almacenado virtualmente en todos los alimentos vegetales (Graf 55 (Ed.), 1986). El ácido fítico forma una parte normal de la semilla en cereales y legumbres. Funciona uniéndose a los minerales de la dieta que son esenciales para la nueva planta a medida que emerge de la semilla. Cuando los grupos fosfato del ácido fítico son separados por la enzima fitasa de la semilla, se pierde la capacidad para unirse a los iones metálicos y los minerales se vuelven disponibles para la planta. En los cereales para la alimentación de ganado, los minerales traza unidos por el ácido fítico permanecen no disponibles en gran parte para la absorción por los animales monogástricos, que carecen de actividad fitasa.

Aunque se produce algo de hidrólisis de fitato en el colon, la mayoría del fitato pasa a través del tracto gastrointestinal de los animales monogástricos y se excreta en el estiércol contribuyendo a los problemas de contaminación por fosfato fecal en áreas de producción intensiva de ganado. El fósforo inorgánico liberado en el colon tiene un valor nutricional apreciablemente disminuido para el ganado puesto que el fósforo inorgánico es absorbido en gran parte -si no virtualmente exclusivamente- en el intestino delgado. De este modo, una cantidad apreciable de los minerales de la dieta nutricionalmente importantes del fitato no está disponible para los animales monogástricos.

ES 2 328 670 T3

En resumen, los nutrientes asociados a fitato comprenden no sólo fosfato que está unido covalentemente al fitato, sino también otros minerales que están quelados también con el fitato. Por otra parte, después de la ingestión, el fitato no hidrolizado puede encontrarse y asociarse con minerales adicionales. La quelación de minerales puede inhibir la actividad de las enzimas para las que estos minerales sirven como co-factores.

5 La conversión de fitato en inositol y fósforo inorgánico puede ser catalizada por enzimas microbianas referidas ampliamente como fitasas. Fitasas tales como la fitasa Núm. EC 3.1.3.8 son capaces de catalizar la hidrólisis de hexafosfato de mio-inositol a 1,2,4,5,6-pentafosfato y ortofosfato de D-mio-inositol. Se informa que algunas fitasas fúngicas hidrolizan pentafosfato de inositol a tetra-, tri-, y fosfatos inferiores. Por ejemplo, se ha informado que 10 fitasas de *A. ficuum* producen mezclas de di- y mono-fosfatos de mioinositol (Ullah, 1988). Los microorganismos que producen fitasa comprenden bacterias tales como *Bacillus subtilis* (Powar y Jagannathan, 1982) y *Pseudomonas* (Cosgrove, 1970); levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* (Nayini y Markakis, 1984); y hongos tales como *Aspergillus terreus* (Yamada *et al.*, 1968).

15 Las fosfatases ácidas son enzimas que hidrolizan catalíticamente una amplia variedad de ésteres fosfato y usualmente exhiben óptimos de pH por debajo de 6,0 (Igarashi & Hollander, 1968). Por ejemplo, las enzimas EC Núm. 3.1.3.2 catalizan la hidrólisis de monoésteres ortofosfóricos a productos de ortofosfato. Se ha informado que una fosfatasa ácida ha sido purificada a partir de *A. ficuum*. La forma desglicosilada de la fosfatasa ácida tiene un peso molecular aparente de 32,6 kDa (Ullah *et al.*, 1987).

20 25 La fitasa y las fosfatases ácidas menos específicas son producidas por el hongo *Aspergillus ficuum* en forma de enzimas extracelulares (Shieh *et al.*, 1969). Se informa que Ullah purificó una fitasa a partir de *A. ficuum* de tipo salvaje que tenía un peso molecular aparente de 61,7 kDa (en SDS-PAGE; corregido para la glicosilación); óptimos de pH a pH 2,5 y pH 5,5; una Km de aproximadamente 40 μ m; y, una actividad específica de aproximadamente 50 U/mg (Ullah, 1988). En la solicitud de patente PCT WO 91/05053 también se describe el aislamiento y la clonación molecular de una fitasa de *Aspergillus ficuum* con óptimos de pH a pH 2,5 y pH 5,5, una Km de aproximadamente 250 μ m, y una actividad específica de aproximadamente 100 U/mg proteína.

30 En resumen, la actividad específica citada para estas enzimas microbianas referidas previamente ha estado aproximadamente en el intervalo de 50-100 U/mg proteína. En contraste, se ha medido que la actividad fitasa descrita en la presente invención es de aproximadamente 4400 U/mg. Esto corresponde aproximadamente a una mejora de la actividad de 40 veces o mayor.

35 La posibilidad de utilizar microbios capaces de producir fitasa como aditivo alimentario para animales ha sido referida previamente (USPN 3.297.548 Shieh y Ware; Nelson *et al.*, 1971). La rentabilidad de este enfoque ha sido una limitación principal para esta y otras aplicaciones comerciales. Por lo tanto son muy deseables las moléculas de fitasa mejoradas.

40 45 También se ha informado que las fitasas microbianas son útiles para producir alimento para animales en algunos procedimientos industriales, p. ej., productos de desecho de trigo y maíz. En un aspecto, el procedimiento de molturación de maíz en mojado produce glútenes comercializados como alimentos para animales. Se informa que la adición de fitasa puede mejorar el valor nutricional del producto alimenticio. Por ejemplo, se ha informado previamente del uso de enzimas fitasa fúngicas y condiciones de procedimiento ($t \sim 50^\circ\text{C}$ y pH ~ 5.5) en (p. ej. EP 0 321 004). En resumen, al transformar harina de soja utilizando métodos de maceración tradicionales, esto es, métodos sin la adición de enzima fitasa exógena, se informa de que la presencia de fitato no hidrolizado produce harina y residuos inadecuados para los alimentos para criar peces, volatería y otros no rumiantes así como terneros alimentados con leche. Se informa que la fitasa es útil para mejorar el valor nutritivo y comercial de este material de soja con alto contenido de proteína (véase Finase Enzymes de Alko, Rajamäki, Finlandia). En Alko, Ltd. se ha utilizado una combinación de fitasa fúngica y una fosfatasa ácida con un óptimo de pH de 2,5 de *A. niger* como suplemento en alimentos para animales en su producto degradativo de ácido fítico Finas F y Finasa S. Sin embargo, la rentabilidad de este enfoque permanece como una limitación principal para un uso más extendido. De este modo una fuente rentable de fitasa podría aumentar considerablemente el valor de las harinas de soja como alimento para animales (Shieh *et al.*, 1969).

50 55 Para resolver los problemas descritos, se ha propuesto el tratamiento de los productos alimenticios con enzimas fitasa exógenas, pero este enfoque no se ha optimizado completamente, particularmente con respecto a la viabilidad y la rentabilidad. Esta optimización requiere la consideración de que existe una amplia gama de aplicaciones, particularmente para la producción a gran escala. Por ejemplo, existe una amplia gama de productos alimenticios, sus métodos de preparación, y especies de organismos receptores.

60 65 En una exemplificación concreta, se aprecia que la fabricación de bolitas de alimento para peces requiere la exposición de los ingredientes a temperaturas y/o presiones elevadas con el fin de producir bolitas que no se disuelven y/o degradan prematuramente (p. ej. antes de su consumo) después del sometimiento al agua. De este modo sería deseable para este procedimiento de fabricación obtener enzimas aditivas que sean estables en condiciones de temperatura y/o presión elevadas. Por lo tanto se aprecia que distintas fitasas pueden ser diferentemente preferibles u óptimas para distintas aplicaciones.

Además se advierte que una manera importante de optimizar un proceso enzimático es a través de la modificación y mejora de la enzima catalítica crucial. Por ejemplo, se puede formar una planta transgénica que comprende un

ES 2 328 670 T3

sistema de expresión para expresar una molécula de fitasa. Se aprecia que intentando mejorar los factores que no están directamente relacionados con la actividad de la molécula expresada apropiada, tal como el nivel de expresión, sólo se puede lograr como máximo un nivel de optimización finito -y potencialmente insuficiente-. Por lo tanto, existe la necesidad de obtener moléculas con características mejoradas.

5 Un modo concreto de lograr mejoras en las características de una molécula es a través de un enfoque tecnológico denominado evolución dirigida, incluyendo los enfoques propiedad de Diversa Corporation para los cuales se ha acuñado y registrado el término DirectEvolution®. Estos enfoques se elaboran adicionalmente en la patente del mismo propietario que Diversa (documento US 5.830.696) así como diferentes solicitudes de patente copendientes. En resumen, DirectEvolution® comprende: a) el sometimiento de uno o más moldes moleculares a mutagénesis para generar moléculas novedosas, y b) la selección entre estas especies de moléculas progenie novedosas con características más deseables.

10

15 Sin embargo, el poder de la evolución dirigida depende de la elección de partida de los moldes de partida, así como del procedimiento o los procedimientos de mutagénesis elegidos y del procedimiento o los procedimientos de escrutinio utilizados. Por ejemplo, el enfoque de generar y evaluar un intervalo completo de permutaciones mutagénicas sobre los moldes moleculares elegidos al azar y/o sobre los moldes moleculares iniciales que tienen propiedades demasiado subóptimas con frecuencia es una tarea prohibitivamente larga. El uso de tales moldes ofrece, como mucho, una ruta subóptima más larga y potencialmente proporciona posibilidades muy escasas de producir moléculas progenie suficientemente mejoradas. Adicionalmente, se aprecia que el cuerpo de conocimientos actual sobre el tema es muy limitado con respecto a la capacidad de pronosticar rigurosamente modificaciones beneficiosas.

20

25 Por consiguiente, un enfoque deseable es descubrir y hacer uso de moléculas que tienen propiedades desarrolladas previamente -preferiblemente ventajas enzimáticas desarrolladas previamente- en la naturaleza. De este modo se aprecia en la presente descripción que la naturaleza proporciona (a través de lo que a veces se ha denominado "evolución natural") moléculas que pueden ser utilizadas inmediatamente en aplicaciones comerciales, o que alternativamente, se pueden someter a evolución dirigida para lograr incluso mejoras mayores.

30 En suma, existe la necesidad de fuentes de actividad fitasa novedosas, altamente activas, fisiológicamente eficaces, y económicas. Específicamente, existe la necesidad de identificar fitasas novedosas que: a) tengan actividades superiores en una o más aplicaciones específicas, y sean de este modo útiles para optimizar estas aplicaciones específicas; b) sean útiles como moldes para la evolución dirigida para lograr moléculas novedosas incluso mejoradas adicionalmente; y c) sean útiles como herramientas para la identificación de moléculas relacionadas adicionales por medios tales como enfoques basados en la hibridación. Esta invención reúne estas necesidades de un modo novedoso.

35

Compendio de la invención

40 La presente invención proporciona un polinucleótido y un polipéptido codificado por el mismo que ha sido identificado como una enzima fitasa que tiene actividad fitasa. De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una enzima recombinante novedosa, así como sus fragmentos activos, análogos y derivados.

45 Más concretamente, esta invención se refiere al uso de moléculas recombinantes de fitasa de origen bacteriano que son útiles para mejorar el valor nutricional de los productos alimenticios que contienen fitato. Publicaciones previas han descrito el uso de fitasas fúngicas, pero el uso de fitasas bacterianas para este propósito es novedoso.

Aún más concretamente, esta invención se refiere al uso de moléculas recombinantes recién identificadas de fitasa con origen en *E. coli* que son útiles para mejorar el valor nutricional de los productos alimenticios que contienen fitato.

50 Este uso comprende emplear las moléculas recién identificadas para hidrolizar fitato en productos alimenticios. La hidrólisis se puede producir antes de la ingestión o después de la ingestión o tanto antes como después de la ingestión del fitato. Esta aplicación es concretamente relevante, pero no está limitada, a organismos no rumiantes e incluye la expresión de las moléculas novedosas de fitasa descritas en anfitriones transformados, el contacto de las moléculas novedosas de fitasa descritas con fitato en productos alimenticios y otras sustancias, y el tratamiento de sistemas digestivos animales con las moléculas novedosas de fitasa descritas.

55

60 Adicionalmente, la hidrólisis se puede producir independientemente del consumo, p. ej. en una aplicación *in vitro*, tal como en un recipiente de reacción. De este modo, el tratamiento de materiales que contienen fitato incluye el tratamiento de una amplia gama de sustancias, incluyendo las que no se pretende que sean productos alimenticios, p. ej. el tratamiento de materiales excrementales (o fecales).

65 Las moléculas de la presente invención incluyen una fitasa recombinante aislada de *Escherichia coli* B que mejora la eficacia de la liberación de fósforo desde el fitato y las sales de ácido fítico en comparación con fitasas fúngicas previamente identificadas.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una enzima fitasa que es útil para la incorporación a productos alimenticios. El polipéptido de este aspecto de la invención es aislado, sintético o recombinante y comprende una secuencia de aminoácidos descrita en la Figura 8 como SEQ ID NO: 8, y tiene una o más modifica-

ES 2 328 670 T3

ciones de aminoácidos seleccionadas entre W68E, Q84W, A95P, K97C, S168E, N226C, Y277D o cualquiera de sus combinaciones.

El polipéptido puede carecer de su secuencia señal homóloga. Puede estar glicosilado. Puede estar inmovilizado.

Más específicamente, se proporciona una enzima fitasa tal que es útil para mejorar el valor nutricional de los productos alimenticios que contienen fitato. Aún más específicamente, se proporciona una enzima fitasa tal que, cuando se aplica a los productos alimenticios que contienen fitato, mejora mediblemente el índice de crecimiento de un organismo que lo consume. Se especula que el mecanismo de acción beneficioso de la actividad fitasa comprende apreciablemente si no sustancialmente la hidrólisis de fitato. Se prevé que la acción beneficiosa se puede producir antes de la ingestión o alternativamente después de la ingestión o alternativamente tanto antes como después de la ingestión de los productos alimenticios que contienen fitato. En el caso en el que la acción beneficiosa se produce después de la ingestión, un objeto de la presente invención es proporcionar una enzima fitasa que tenga una actividad que se conserve después de su consumo por organismos no rumiantes.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona un polinucleótido aislado, sintético o recombinante que codifica un polipéptido del primer aspecto de la presente invención -incluyendo ARNm, ADN, ADNc, ADN genómico- así como derivados activos, análogos y fragmentos de tal enzima.

De acuerdo con otro aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un procedimiento para producir tales polipéptidos mediante técnicas recombinantes que comprende cultivar células anfítrionas procarióticas y/o eucarióticas recombinantes, que contienen un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención, en condiciones que promueven la expresión de dicho polipéptido y la posterior recuperación de dicho polipéptido.

De acuerdo con otro aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un procedimiento para expresar tales polipéptidos, o los polinucleótidos que codifican tales polipéptidos en plantas transgénicas u órganos de plantas y métodos para la producción de tales plantas. Esto se puede lograr introduciendo en una planta un constructo de expresión que comprende un nucleótido que codifica tales polipéptidos.

De acuerdo con otro aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un procedimiento para utilizar tales polipéptidos, o polinucleótidos que codifican tales polipéptidos para su uso en procedimientos comerciales, tales como, por ejemplo, procedimientos que liberan minerales desde los fitatos en materiales vegetales *in vitro*, *es decir*, en procedimientos de tratamiento de alimentos.

De acuerdo con otro aspecto adicional de la presente invención, se proporcionan productos alimenticios elaborados mediante los procedimientos de tratamiento de alimentos descritos.

También se proporciona un organismo no humano transgénico cuyo genoma comprende una secuencia de ácido nucleico heteróloga de acuerdo con la invención y que codifica un polipéptido que tiene actividad fitasa, donde dicho transgén da como resultado la expresión de un polipéptido de fitasa.

Otros aspectos de la invención se presentan en las reivindicaciones adjuntas.

Estos y otros aspectos de la presente invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de las enseñanzas de la presente memoria.

Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos son ilustrativos de las realizaciones de la invención y no se pretende que limiten el alcance de la invención abarcado por las reivindicaciones.

La Figura 1 muestra la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos deducida del polipéptido de la presente invención. La secuenciación se realizó utilizando un secuenciador de ADN automático 378 (Applied Biosystems, Inc.).

La Figura 2 muestra el perfil de pH y temperatura y los datos de estabilidad para el polipéptido de la presente invención. La prueba utilizada para este análisis es la siguiente para la detección de actividad fitasa: La actividad fitasa se mide incubando 150 μl de la preparación de polipéptido con 600 μl de fitato sódico 2 mM en tampón Tris-HCl 100 mM pH 7,5, con un suplemento de CaCl_2 1 mM durante 30 minutos a 37°C. Después de la incubación la reacción se detiene añadiendo 750 μl de ácido tricloroacético al 5%. El fosfato liberado se midió frente al patrón de fosfato espectrofotométricamente a 700 nm después de añadir 1500 μl del reactivo coloreado (4 volúmenes de molibdato de amonio al 1,5% en ácido sulfúrico al 5,5% y 1 volumen de sulfato ferroso al 2,7%; Shimizu, 1992). La DO a 700 nm se indica en el eje de las Y de los gráficos en la Figura 2. La temperatura o el pH se indican en el eje de las X de los gráficos.

La Figura 3 muestra un gráfico con los resultados de un análisis de tolerancia térmica entre el SEQ ID NO: 8 y el SEQ ID NO: 10 (fitasa modificada).

La Figura 4 muestra un gráfico con la estabilidad de las enzimas fitasa en condiciones de digestibilidad simuladas.

ES 2 328 670 T3

La Figura 5 muestra un gráfico con la expresión de la fitasa de tipo salvaje y modificada (SEQ ID NO: 10) en diferentes células anfitrionas.

La Figura 6 muestra un gráfico de la actividad fitasa residual en SGF con pepsina.

Las Figuras 7A y 7B muestran la secuencia de nucleótidos la Fitasa appA de *E. coli* (SEQ ID NO: 7).

Figura 8 muestra la secuencia de aminoácidos de la Fitasa appA de *E. coli* (SEQ ID NO: 8) y una fitasa modificada (SEQ ID NO: 10).

10 Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un polipéptido térmicamente estable que tiene una secuencia de polinucleótidos y polipéptidos modificada de tal manera que proporciona una fitasa que tiene una estabilidad térmica aumentada en comparación con otras enzimas fitasa. La expresión de esta nueva fitasa en *S. pombe* o *P. pastoris*, por ejemplo, dio como resultado la producción de variantes glicosiladas que mostraron tolerancia térmica adicional.

Las moléculas de fitasa de la presente invención son novedosas con respecto a sus estructuras. Adicionalmente, las presentes moléculas de fitasa son evidentemente novedosas con respecto a su actividad. Por ejemplo, utilizando un análisis (como se describe en Food Chemicals Codex, 4^a Ed.) se demostró que la actividad de la presente enzima fitasa era muy superior en comparación con un control de fitasa fúngica (*Aspergillus*). Específicamente, varios experimentos mostraron que la fitasa de *E. coli* tenía una actividad de aproximadamente 4400 unidades/mg y la fitasa de *Aspergillus* tenía una actividad de aproximadamente 105 unidades/mg. Esto corresponde a una diferencia de actividad de más de 40 veces. Con el fin de facilitar la comprensión de los ejemplos proporcionados en la presente memoria, se describirán algunos métodos y/o términos que aparecen con frecuencia.

El término “anticuerpo,” según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a moléculas de inmunoglobulina intactas, así como fragmentos de moléculas de inmunoglobulina, tales como fragmentos Fab, Fab’, (Fab’)₂, Fv, y SCA, que son capaces de unirse a un epítopo de un polipéptido de fitasa. Estos fragmentos de anticuerpo, que conservan alguna capacidad para unirse selectivamente al antígeno (p. ej., un antígeno de fitasa) del anticuerpo del que derivan, se pueden elaborar utilizando métodos bien conocidos en la técnica (véase, p. ej., Harlow y Lane, *supra*), y se describen adicionalmente, a continuación.

1. 1. (1) Un fragmento Fab consiste en un fragmento de unión al antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo, y se puede producir mediante digestión de una molécula completa de anticuerpo con la enzima papaína, para producir un fragmento que consiste en una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada.
2. 2. (2) Un fragmento Fab’ de una molécula de anticuerpo se puede obtener tratando una molécula completa de anticuerpo con pepsina, seguido de reducción, para producir una molécula que consiste en una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada. Se obtienen dos fragmentos Fab’ por molécula de anticuerpo tratada de esta manera.
3. 3. (3) Se puede obtener un fragmento (Fab’)₂ de un anticuerpo tratando una molécula completa de anticuerpo con la enzima pepsina, sin posterior reducción. Un fragmento (Fab’)₂ es un dímero de dos fragmentos Fab’, mantenidos juntos mediante dos enlaces disulfuro.
4. 4. (4) Un fragmento Fv se define como un fragmento diseñado genéticamente que contiene la región variable de una cadena ligera y la región variable de una cadena pesada expresado en forma de dos cadenas.
5. 5. (5) Un anticuerpo de cadena sencilla (“SCA”) es una molécula de cadena sencilla diseñada genéticamente que contiene la región variable de una cadena ligera y la región variable de una cadena pesada, conectadas por un conector polipeptídico flexible, adecuado.

55 El término cantidad “efectiva en la degradación” hace referencia a la cantidad de enzima que se requiere para degradar al menos el 50% del fitato, en comparación con el fitato que no está en contacto con la enzima. Preferiblemente, se degrada al menos el 80% del fitato.

“Digestión” de ADN hace referencia a una escisión catalítica del ADN con una enzima de restricción que actúa sólo en ciertas secuencias en el ADN. Las diferentes enzimas de restricción utilizadas en la presente memoria son asequibles comercialmente y sus condiciones de reacción, cofactores y otros requerimientos se utilizaron como conocerán los expertos normales en la técnica. Con fines analíticos, se utiliza típicamente 1 µg de plásmido o fragmento de ADN con aproximadamente 2 unidades de enzima en aproximadamente 20 µl de solución tampón. Con el fin de aislar los fragmentos de ADN para la construcción del plásmido, se digieren típicamente de 5 a 50 µg de ADN con 20 a 250 unidades de enzima en un volumen mayor. Los tampones y las cantidades de sustrato apropiados para las enzimas de restricción concretas están especificados por el fabricante. Normalmente se utilizan tiempos de incubación de aproximadamente 1 hora a 37°C, pero pueden variar de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Después de digestión la reacción se somete a electroforesis directamente en un gel para aislar el fragmento deseado.

ES 2 328 670 T3

Según se utiliza en esta invención, el término “epítopo” hace referencia a un determinante antigénico en un antígeno, tal como un polipéptido de fitasa, al que se une el paratopo de un anticuerpo, tal como un anticuerpo específico de fitasa. Los determinantes antigenicos usualmente consisten en agrupamientos de moléculas superficiales químicamente activas, tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares, y pueden tener características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas.

Los términos “fragmento”, “derivado” y “análogo” cuando se refieren a la enzima de la Figura 1 comprenden una enzima que conserva al menos una función o actividad biológica que es al menos esencialmente la misma que la de la enzima de referencia. Además, los términos “fragmento”, “derivado” o “análogo” son ilustrados por una molécula en “forma pro”, tal como una proproteína de baja actividad que puede ser modificada mediante escisión para producir una enzima madura con una actividad significativamente mayor.

El término “gen” significa el segmento de ADN implicado en la producción de una cadena polipeptídica; incluye regiones precedentes y posteriores a la región codificante (líder y trailer) así como secuencias intermedias (intrones) entre los segmentos codificantes individuales (exones).

El término “aislado” significa que el material es retirado de su entorno original (p. ej., el entorno natural si es de origen natural). Por ejemplo, un polinucleótido o una enzima de origen natural presentes en un animal vivo no están aislados, pero los mismos polinucleótidos o enzimas, separados de algunos o todos los materiales coexistentes en el sistema natural, están aislados. Tales polinucleótidos podrían ser parte de un vector y/o tales polinucleótidos o enzimas podrían ser parte de una composición, y todavía ser aislados ya que tal vector o composición no es parte de su entorno natural.

Por “ácido nucleico aislado” se quiere significar un ácido nucleico, p. ej., una molécula de ADN o ARN aislada, que no es inmediatamente contigua a las secuencias límitrofes 5’ y 3’ a las que normalmente es inmediatamente contigua cuando está presente en el genoma de origen natural del organismo del que deriva. El término describe de este modo, por ejemplo, un ácido nucleico que se incorpora a un vector, tal como un plásmido o vector viral; un ácido nucleico que se incorpora al genoma de una célula heteróloga (o al genoma de una células homóloga, pero en un sitio diferente del que aparece naturalmente); y un ácido nucleico que existe como una molécula separada, p. ej., un fragmento de ADN producido mediante amplificación PCR o digestión mediante enzimas de restricción, o una molécula de ARN producida mediante transcripción *in vitro*. El término también describe un ácido nucleico recombinante que forma parte de un gen híbrido que codifica secuencias polipeptídicas adicionales que se pueden utilizar, por ejemplo, en la producción de una proteína de fusión.

“Ligación” hace referencia al procedimiento de formación de enlaces fosfodiéster entre dos fragmentos de ácido nucleico bicatenarios (Sambrook *et al.*, 1989). A no ser que se proporcione de otro modo, la ligación se puede completar utilizando tampones y condiciones conocidos con 10 unidades de ADN ligasa de T4 (“ligasa”) por 0,5 µg de cantidades aproximadamente equimolares de los fragmentos de ADN que se vayan a ligar.

Según se utiliza en la presente memoria, una “molécula de ácido nucleico” comprende al menos una base nucleotídica o un par de bases nucleotídicas, dependiendo de si es monocatenario o bicatenario, respectivamente. Además, una molécula de ácido nucleico puede pertenecer exclusivamente o químicamente a cualquier grupo de moléculas que contienen nucleótidos, como se ilustra mediante, pero no limitados a, los siguientes grupos de moléculas de ácidos nucleicos: ARN, ADN, ácidos nucleicos genómicos, ácidos nucleicos no genómicos, ácidos nucleicos de origen natural y de origen no natural, y ácidos nucleicos sintéticos. Ésta incluye, a modo de ejemplo no limitante, ácidos nucleicos asociados con cualquier orgánulo, tales como la mitocondria, el ARN ribosómico, y moléculas de ácidos nucleicos compuestos químicamente de uno o más componentes que no son de origen natural junto con componentes de origen natural.

Adicionalmente, una “molécula de ácido nucleico” puede contener en parte uno o más componentes con una base no nucleotídica como se ilustra mediante, pero no limitados a, aminoácidos y azúcares. De este modo, a modo de ejemplo, pero sin limitación, se considera que una ribozima que tiene en parte una base nucleotídica y en parte una base proteica es una “molécula de ácido nucleico”.

Además, a modo de ejemplo, pero no de limitación, se considera igualmente que una molécula de ácido nucleico que esta marcada con un radical detectable, tal como una marca radiactiva o alternativamente una no radiactiva, es una “molécula de ácido nucleico”.

Los términos “secuencia de ácido nucleico que codifica” o “ADN que codifica una secuencia de” o una “secuencia de nucleótidos que codifica” una enzima particular -así como otros términos sinónimos- hacen referencia a una secuencia de ADN que es transcrita y traducida a una enzima cuando se coloca bajo el control de las secuencias reguladoras apropiadas. Una “secuencia promotora” es una región reguladora de ADN capaz de unirse a la ARN polimerasa en una célula e iniciar la transcripción de una secuencia codificante aguas abajo (dirección 3’). El promotor es parte de la secuencia de ADN. Esta región de la secuencia tiene un codón de inicio en su extremo 3’. La secuencia promotora no incluye el número mínimo de bases donde unir los elementos necesarios para iniciar la transcripción a niveles detectables por encima del fondo. Sin embargo, después de que la ARN polimerasa se une a la secuencia y se inicia la transcripción en el codón de inicio (extremo 3’ con un promotor), la transcripción prosigue aguas abajo en dirección 3’. En la secuencia promotora se encontrará un sitio de iniciación de la transcripción (convenientemente definido me-

ES 2 328 670 T3

diente mapeo con la nucleasa S1) así como dominios de unión a proteínas (secuencias consenso) responsables de la unión de la ARN polimerasa.

- Los términos “ácido nucleico que codifica una enzima (proteína)” o “ADN que codifica una enzima (proteína)” o 5 “polinucleótido que codifica una enzima (proteína)” y otros términos sinónimos abarcan un polinucleótido que incluye sólo la secuencia codificante para la enzima así como un polinucleótido que incluye secuencias codificantes y/o no codificantes adicionales.

En una realización preferida, una “especie de molécula de ácido nucleico específica” se define por su estructura química, como se ilustra mediante, pero no limitada a, su secuencia primaria. En otra realización preferida, una 10 “especie de molécula de ácido nucleico” específica se define por la función de la especie de ácido nucleico o por la función de un producto derivado de la especie de ácido nucleico. Así, a modo de ejemplo no limitante, una “especie de molécula de ácido nucleico específica” se puede definir por una o más actividades o propiedades atribuibles a ella, incluyendo actividades o propiedades atribuibles a su producto expresado.

15 La presente definición de “ensamblar una muestra de ácido nucleico de trabajo en una genoteca de ácido nucleico” incluye el procedimiento de incorporar una muestra de ácido nucleico a una colección basada en un vector, por ejemplo mediante ligación en un vector y transformación de un anfitrión. Más adelante se proporciona una descripción de los vectores, anfitriones, y otros reactivos relevantes así como sus ejemplos no limitantes específicos. La presente 20 definición de “ensamblar una muestra de ácido nucleico de trabajo en una genoteca de ácido nucleico” también incluye el procedimiento de incorporar una muestra de ácido nucleico a una colección no basada en vectores, por ejemplo mediante ligación a adaptadores. Preferiblemente los adaptadores se pueden recoger con cebadores de PCR para facilitar la amplificación mediante PCR.

25 Por lo tanto, en una realización no limitante, una “genoteca de ácido nucleico” comprende una colección basada en vectores de una o más moléculas de ácido nucleico. En otra realización preferida una “genoteca de ácido nucleico” comprende una colección de moléculas de ácido nucleico no basada en vectores. En otra nueva realización preferida una “genoteca de ácido nucleico” comprende una colección combinada de moléculas de ácido nucleico que está en parte basada en vectores y en parte no basada en vectores. Preferiblemente, la colección de moléculas que comprende 30 una genoteca es inspeccionable y separable de acuerdo con la especie de molécula de ácido nucleico individual.

La presente invención proporciona un “constructo de ácido nucleico” o alternativamente un “constructo de nucleótidos” o alternativamente un “constructo de ADN”. El término “constructo” se utiliza en la presente memoria para describir una molécula, tal como un polinucleótido (p. ej., un polinucleótido de fitasa) que puede estar opcionalmente 35 unido químicamente a uno o más radicales moleculares adicionales, tales como un vector, o partes de un vector. En un aspecto específico -pero de ningún modo limitante-, un constructo de nucleótidos es ilustrado por un constructo de expresión de ADN para la expresión del ADN adecuado para la transformación de una célula anfitriona.

“Oligonucleótidos” hace referencia a un polidesoxinucleótido monocatenario o dos cadenas de polidesoxinucleótidos complementarias que se pueden sintetizar químicamente. Tales oligonucleótidos sintéticos pueden tener o no un fosfato 5’. Los que lo tienen no se unirán a otro oligonucleótido sin añadir un fosfato con un ATP en presencia de una quinasa. Un oligonucleótido sintético se unirá a un fragmento que no ha sido desfosforilado.

Una secuencia codificante está “conectada operablemente a” otra secuencia codificante cuando la ARN polimerasa 45 transcriba las dos secuencias codificantes a un ARNm sencillo, que después es traducido a un polipéptido sencillo que tiene aminoácidos derivados de ambas secuencias codificantes. No se necesita que las secuencias codificantes sean contiguas entre sí con tal que las secuencias expresadas sean procesadas en última instancia para producir la proteína deseada.

50 El término “sonda específica de fitasa”, en el contexto de este método de la invención, hace referencia a sondas que se unen a los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de fitasa, o a sus secuencias complementarias, a un grado detectablemente mayor que los ácidos nucleicos que codifican otras enzimas, o a sus secuencias complementarias.

En sentido estricto, los términos “fitato”, “ácido fítico”, y “fitina”, se pueden diferenciar como sigue: “fitato,” hace 55 referencia a una forma aniónica de ácido fítico; “ácido fítico” hace referencia a hexafosfato de inositol, un compuesto que aparece naturalmente en las plantas, incluyendo particularmente hojas de plantas, y que puede servir como sustrato para la enzima fitasa; y “fitina” hace referencia a una sal de ácido fítico, tal como una sal de calcio-magnesio de ácido fítico. Se entiende, por lo tanto, que “fitato”, “ácido fítico”, y “fitina” son formas químicamente relacionadas y interconvertibles que tienen una estructura química compartida. Según se utiliza en la presente memoria, por lo 60 tanto, “fitato”, “ácido fítico”, y “fitina” son términos intercambiables en tanto que están altamente relacionados, son similares, son interconvertibles químicamente, y todos (con o sin dicha interconversión química) pueden ser sometidos a degradación por la enzima fitasa novedosa descrita en la presente memoria. Por lo tanto, cuando sólo se utiliza uno de los términos “fitato”, “ácido fítico”, o “fitina” en las descripciones de los métodos descritos en la presente memoria, se entiende que funcionan como un término representativo que hace referencia adicionalmente a cualquier sustrato de 65 la enzima fitasa incluyendo “fitasa”, “ácido fítico”, y “fitina”.

Un “polinucleótido” es una molécula compuesta de 2 o más bases nucleotídicas o pares de bases nucleotídicas.

ES 2 328 670 T3

Una molécula que tiene una “forma pre” o una “forma pro” hace referencia a una molécula que experimenta cualquier combinación de una o más modificaciones químicas covalentes y no covalentes (p. ej. glicosilación, escisión proteolítica, dimerización o oligomerización, cambio conformacional inducido por temperatura o inducido por pH, asociación con un cofactor, etc.) en vías de lograr una forma molecular más madura que tiene una diferencia de

- 5 propiedades (p. ej. un aumento de actividad) en comparación con la molécula en forma pro de referencia. Cuando una molécula precursora en “forma pre” o en “forma pro” es capaz de experimentar dos o más modificaciones químicas (p. ej. dos escisiones proteolíticas, o una escisión proteolítica y un cambio de glicosilación) en vías a la producción de una molécula madura, también se puede utilizar el término “forma pre-pro” en referencia a la molécula precursora. Por lo tanto, una pre-pro-enzima es una enzima en “forma pre-pro”. Igualmente, una pre-pro-hormona es una hormona 10 en “forma pre-pro”.

Según se utiliza en la presente memoria, el término “reactivo” incluye moléculas de fitasa de la presente invención. Preferiblemente, tales moléculas de fitasa catalizan la hidrólisis de fitato a inositol y fosfato libre con liberación de minerales desde el complejo de ácido fítico. Una molécula de fitasa ilustrativa es una fitasa derivada de *Escherichia coli* B. Esta enzima ilustrativa se muestra en la Figura 1, SEQ ID NO: 2. Adicionalmente, según se utiliza en la presente memoria, el término “reactivo” incluye moléculas de reactivo sustrato de la presente invención, tales como moléculas de fitato. Preferiblemente, tales moléculas de fitato se encuentran en productos alimenticios, productos alimenticios potenciales, subproductos de productos alimenticios (tanto en subproductos *in vitro* como subproductos *in vivo*, p. ej. productos de reacción *ex vivo* y productos excrementales animales), precursores de productos alimenticios, y cualquier 15 otra fuente de fitato.

Enzimas “recombinantes” hace referencia a enzimas producidas mediante técnicas de ADN recombinante, es decir, producidas a partir de células transformadas con un constructo de ADN exógeno que codifica la enzima deseada. Enzimas “sintéticas” son aquellas preparadas mediante síntesis química.

20 Como es conocido en la técnica la “similitud” entre dos enzimas se determina comparando la secuencia de aminoácidos y sus sustitutos de aminoácidos conservados de una enzima con la secuencia de una segunda enzima. La similitud se puede determinar mediante procedimientos que son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, un programa BLAST (Herramienta de Búsqueda de Alineamientos Locales Básicos por “Basic Local Alignment Search Tool” del Centro Nacional de Información Biológica).

30 Se dice que los miembros de un par de moléculas (p. ej., un par anticuerpo-antígeno o un par ácido nucleico) se “unen específicamente” entre sí si se unen entre sí con mayor afinidad que a otras moléculas no específicas. Por ejemplo, se puede describir que un anticuerpo originado contra un antígeno al que se une más eficazmente que a otra 35 proteína no específica se une específicamente al antígeno. (Similarmente, se puede describir que un ácido nucleico sonda se une específicamente a un ácido nucleico diana si forma un dúplex específico con la diana mediante interacciones de pares de bases (véase lo anterior).)

40 “Condiciones de hibridación restrictivas” significa que la hibridación se producirá sólo si existe al menos 90% de identidad, preferiblemente al menos 95% de identidad y muy preferiblemente al menos 97% de identidad entre las secuencias. Véase Sambrook *et al.*, 1989.

45 Una secuencia de aminoácidos “sustancialmente idéntica” es una secuencia que difiere de una secuencia o secuencias de referencia sólo en las sustituciones de aminoácidos conservativas, por ejemplo, sustituciones de un aminoácido por otro de la misma clase (p. ej., sustitución de un aminoácido hidrófobo, tal como isoleucina, valina, leucina, o metionina, por otro, o sustitución de un aminoácido polar por otro, tal como la sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico, o glutamina por asparagina).

50 Adicionalmente una secuencia de aminoácidos “sustancialmente idéntica” es una secuencia que difiere de una secuencia o secuencias de referencia en una o más sustituciones, delecciones, o inserciones no conservativas, particularmente cuando tal sustitución se produce en un sitio que no es el sitio activo de la molécula, y siempre que el polipéptido conserve esencialmente sus propiedades de funcionamiento. Por ejemplo, se pueden suprimir uno o más 55 aminoácidos de un polipéptido de fitasa, dando como resultado la modificación de la estructura del polipéptido, sin alterar significativamente su actividad biológica. Por ejemplo, se pueden eliminar los aminoácidos amino- o carboxilo-terminales que no son requeridos para la actividad biológica de la fitasa. Tales modificaciones pueden dar como resultado el desarrollo de polipéptidos de fitasa activos más pequeños.

60 La presente invención proporciona una “enzima sustancialmente pura”. El término “enzima sustancialmente pura” se utiliza en la presente memoria para describir una molécula, tal como un polipéptido (p. ej., un polipéptido de fitasa, o uno de sus fragmentos) que está sustancialmente libre de otras proteínas, lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos, y otras sustancias biológicas con las que se asocia naturalmente. Por ejemplo, una molécula sustancialmente pura, tal como un polipéptido, puede ser al menos en un 60%, en peso seco, la molécula de interés. La pureza de los polipéptidos se puede determinar utilizando métodos convencionales incluyendo, p. ej., electroforesis en gel de poliacrilamida (p. ej., SDS-PAGE), cromatografía en columna (p. ej., cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)), y análisis de la secuencia de aminoácidos amino terminal.

65 La presente invención proporciona una enzima recombinante purificada que cataliza la hidrólisis de fitato a inositol y fosfato libre con liberación de minerales desde el complejo de ácido fítico. Una enzima purificada ilustrativa es una fitasa derivada de *Escherichia coli* B.

ES 2 328 670 T3

La enzima fitasa del SEQ ID NO:2 tiene un peso molecular de aproximadamente 47.056 kilodaltons medido mediante SDS-PAGE e inferido de la secuencia de nucleótidos del gen. El pI es 6,70. El perfil de pH y los datos de temperatura y estabilidad para esta enzima se presentan en la Figura 2. Esta enzima purificada se puede utilizar para catalizar la hidrólisis de fitato a inositol y fosfato libre cuando se deseé. La enzima fitasa tiene una elevada termoestabilidad; de este modo es útil concretamente para aplicaciones con aumento de temperatura y/o presión incluyendo,

- 5 pero no limitadas a, la preparación de bolitas de producto alimenticio para peces que no se disolverán prematuramente en agua.

10 Los polipéptidos de fitasa incluidos en la invención tienen la secuencia de aminoácidos de la fitasa mostrada en la Figura 8 (SEQ ID NO : 8), modificada como se ha mencionado. Los polipéptidos de fitasa, tales como los aislados de *E. coli* B, pueden estar caracterizados por catalizar la hidrólisis de fitato a inositol y fosfato libre con liberación de minerales desde el complejo de ácido fítico.

15 La homología o identidad se mide a menudo utilizando soporte lógico para el análisis de secuencia (por ej., Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705). Tal soporte lógico empareja secuencias similares mediante la asignación de grados de homología a diferentes delecciones, sustituciones y otras modificaciones. Los términos "homología" e "identidad" en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos, hacen referencia a dos o más secuencias o subsecuencias que son las mismas o tienen porcentajes especificados de residuos aminoácido o nucleótido que son los mismos cuando se comparan o alinean para la correspondencia máxima a lo largo de una ventana de comparación o región designada medida utilizando cualquier número de algoritmos de comparación de secuencias o mediante alineamiento manual e inspección visual.

20 Para la comparación de secuencias, una secuencia actúa típicamente como secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de ensayo, no obstante se puede utilizar una base de datos de secuencias de referencia. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de las subsecuencias, si fuera necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmos de secuencia. Se pueden utilizar los parámetros del programa por defecto, o se pueden designar parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de la secuencia calcula después el porcentaje de identidades de secuencia para las secuencias de ensayo con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

25 Una "ventana de comparación", según se utiliza en la presente memoria, incluye la referencia a un segmento de cualquiera de las posiciones contiguas seleccionadas del grupo que consiste en 20 a 600, usualmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 200, más usualmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 150 en el que una secuencia se puede comparar con una secuencia de referencia con mismo número de posiciones contiguas después de alinear óptimamente las dos secuencias. Los métodos de alineamiento de secuencia para la comparación son bien conocidos en la técnica. Los alineamientos de secuencias óptimos para la comparación se pueden realizar, p. ej., mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482, 1981, mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol 48:443, 1970, mediante la búsqueda en el método de similitud de Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA del Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineamiento manual e inspección visual. Otros algoritmos para determinar la homología o la identidad incluyen, por ejemplo, además de un programa BLAST (Basic 30 Local Alignment Search Tool del National Center for Biological Information), ALIGN, AMAS (Analysis of Multiply Aligned Sequences), AMPS (Protein Multiple Sequence Alignment), ASSET (Aligned Segment Statistical Evaluation Tool), BANDS, BESTSCOR, BIOSCAN (Biological Sequence Comparative Analysis Node), BLIMPS (Blocks IMProved Searcher), FASTA, Intervals & Points, BMB, CLUSTAL V, CLUSTAL W, CONSENSUS, LCONSENSUS, WCONSENSUS, algoritmo de Smith-Waterman, DARWIN, FNAT (Forced Nucleotide Alineamiento Tool), Framealign, Framesearch, DYNAMIC, FILTER, FSAP (Fristensky Sequence Analysis Package), GAP (Global Alignment Program), GENAL, GIBBS, GenQuest, ISSC (Sensitive Sequence Comparison), LALIGN (Local Sequence Alignment), LCP (Local Content Program), MACAW (Multiple Alignment Construction & Analysis Workbench), MAP (Multiple Alignment Program), MBLKP, MBLKN, PIMA (Pattern-Induced Multi-sequence Alignment), SAGA (Sequence Alignment by Genetic Algorithm) y WHAT-IF. Tales programas de alineamiento se pueden 35 utilizar también para escrutar bases de datos de genomas para identificar las secuencias de polinucleótidos que tienen secuencias sustancialmente idénticas. Están disponibles varias bases de datos de genomas, por ejemplo, una porción sustancial del genoma humano está disponible como parte del Proyecto de Secuenciación del Genoma Humano "Human Genome Sequencing Project" (J. Roach, http://weber.u.Washington.edu/~roach/human_genome_progress_2.html) (Gibbs, 1995). Ya se han secuenciado al menos veintiún genomas diferentes, incluidos, por ejemplo, *M. genitalium* (Fraser *et al.*, 1995), *M. jannaschii* (Bult *et al.*, 1996), *H. influenzae* (Fleischmann *et al.*, 1995), *E. coli* (Blattner *et al.*, 1997), y levadura (*S. cerevisiae*) (Mewes *et al.*, 1997), y *D. melanogaster* (Adams *et al.*, 2000). También se ha realizado un progreso significativo en la secuenciación de genomas de organismos modelo, tales como ratón, *C. elegans*, y *Arabidopsis sp*. Ciertas bases de datos que contienen información genómica anotada con alguna información funcional son mantenidas por una organización diferente, y son accesibles a través de internet, por ejemplo, www.ncbi.nlm.nih.gov; www.ebi.ac.uk; <http://Pasteur.fr/oter/biology>; y www.genoma.wi.mit.edu.

ES 2 328 670 T3

Un ejemplo de algoritmo útil son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que son descritos por Altschul *et al.*, Nuc. Acids Res. 25:3389-3402, 1997, y Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990, respectivamente. El soporte lógico para realizar los análisis BLAST está disponible al público a través del Centro Nacional para la Información Biotecnológica “National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica

5 primero la identificación de pares de secuencias de alta puntuación (HSP) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia problema, que o coinciden o satisfacen cierta puntuación T umbral de valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T es referido como el
10 umbral de puntuación de la palabra cercana (Altschul *et al.*, *supra*). Estos éxitos con la palabra cercana iniciales actúan como siembras para iniciar las búsquedas para encontrar los HSP más largos que las contienen. Las palabras acertadas se prolongan en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia durante tanto como se pueda incrementar la puntuación de alineamiento cumulativa. Las puntuaciones cumulativas se calculan utilizando, para las secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación recompensa para un par de residuos de emparejamiento; siempre >0). Para la secuencia
15 de aminoácidos, se utiliza una matriz de puntuación para calcular la puntuación cumulativa. La prolongación de las palabras acertadas en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento cumulativa decae en una cantidad X desde su valor máximo logrado; la puntuación cumulativa tiende a cero o menos, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos de puntuación negativa; o se alcanza el final de cada secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T, y X determinan la sensibilidad y la velocidad del alineamiento. El programa BLASTN
20 (para la secuencia de nucleótidos) utiliza por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M=5, N=4 y una comparación de ambas hebras. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza por defecto una longitud de palabra de 3, y expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915, 1992) alineamiento (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=-4,
25 y una comparación de ambas cadenas.

El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, p. ej., Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873, 1993). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad mínima de la suma (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por medio de la cual podría ocurrir por casualidad un emparejamiento entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad mínima de la suma en una comparación del ácido nucleico de ensayo con el ácido nucleico de referencia es menor de aproximadamente 0,2, más preferiblemente menos de aproximadamente 0,01, y muy preferiblemente menos de aproximadamente 0,001.

En una realización, las homologías entre una secuencia de proteínas y de ácidos nucleicos se evalúan utilizando la Herramienta de Búsqueda de Alineamientos Locales Básicos (“BLAST”). En particular, se utilizan cinco programas BLAST específicos para realizar las siguientes tareas:

1. (1) BLASTP y BLAST3 comparan una secuencia de aminoácidos problema con una base de datos de secuencias de proteínas;
 - 40 2. (2) BLASTN compara una secuencia de nucleótido problema con una base de datos de secuencias de nucleótidos;
 3. (3) BLASTX compara los productos de la traducción conceptual de seis marcos de una secuencia de nucleótidos problema (ambas cadenas) con una base de datos de secuencias de proteína;
 - 45 4. (4) TBLASTN compara una secuencia de proteínas problema con una base de datos de secuencias de nucleótidos traducida en los seis marcos de lectura (ambas cadenas)
- y
- 50 5. (5) TBLASTX compara las traducciones de los seis marcos de una secuencia de nucleótidos problema con las traducciones de los seis marcos de una base de datos de secuencias de nucleótidos.

Los programas BLAST identifican secuencias homólogas identificando segmentos similares, que son referidos en la presente memoria como “pares de segmentos de alta puntuación”, entre una secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos problema y una secuencia de ensayo que se obtiene preferiblemente a partir de una base de datos de secuencias de proteínas o de ácidos nucleicos. Los pares de segmentos de alta puntuación se identifican preferiblemente (es decir, alinean) por medio de matrices de puntuación, muchas de las cuales son conocidas en la técnica. Preferiblemente, la matriz de puntuación utilizada es la matriz BLOSUM62 (Gonnet *et al.*, Science 256: 1443-1445, 1992; Henikoff y Henikoff, Proteins 17: 49-61, 1993). Menos preferiblemente, también se utilizan las matrices PAM o PAM250 (véase, p. ej., Schwartz y Dayhoff, eds., 1978, Matrices for Detecting Distance Relationships: Atlas of Protein Sequence and Structure, Washington: National Biomedical Research Foundation). Los programas BLAST son accesibles a través de la U.S. National Library of Medicine.

65 Los parámetros utilizados con los algoritmos anteriores se pueden adaptar dependiendo de la longitud de la secuencia y del grado de homología estudiado. En algunas realizaciones, los parámetros pueden ser los parámetros por defecto utilizados por los algoritmos en ausencia de instrucciones del usuario.

ES 2 328 670 T3

- Un análogo, derivado, o fragmento de la enzima de la Figura 1 puede ser (a) uno en el que uno o más de los residuos de aminoácidos están sustituidos por un residuo de aminoácido que no está codificado por el código genético, o (b) uno en el que uno o más de los residuos de aminoácidos incluyen un grupo sustituyente, o (c) uno en el que la enzima madura se fusiona con otro compuesto, tal como un compuesto que aumenta la vida media de la enzima 5 (por ejemplo, polietilenglicol), o (d) proporcionar una marca o etiqueta, tal como una etiqueta 6xHis o una etiqueta de proteína fluorescente verde, (e) uno en el que los aminoácidos adicionales se fusionan a la enzima madura, tal como una secuencia líder o secretora o una secuencia que se emplea para la purificación de la enzima madura o una secuencia de proproteínas.
- 10 Una variante, p. ej., una enzima “fragmento”, “análogo” o “derivado”, y una enzima de referencia pueden diferir en la secuencia de aminoácidos en una o más sustituciones, adiciones, delecciones, fusiones y truncamientos, que pueden estar presentes en cualquier combinación.
- 15 Entre las variantes preferidas se encuentran aquellas que varían de una referencia mediante sustituciones de aminoácidos conservativas. Tales sustituciones son aquellas que sustituyen un aminoácido dado en un polipéptido por otro aminoácido de características parecidas. Típicamente observadas como sustituciones conservativas están los reemplazos, uno por otro, entre los aminoácidos alifáticos Ala, Val, Leu e Ile; el intercambio de residuos hidroxilo Ser y Thr, el cambio de residuos ácidos Asp y Glu, la sustitución entre los residuos amida Asn y Gln, el cambio de los residuos 20 alcalinos Lys y Arg y los reemplazos entre los residuos aromáticos Phe, Tyr.
- 20 De este modo, en una exemplificación particular no limitante, una sustitución puede comprender una sustitución de un aminoácido por otro aminoácido con una propiedad parecida. En otra exemplificación particular no limitante, una sustitución puede comprender una sustitución de un aminoácido por un aminoácido distinto, donde el cambio es no inhibidor o silencioso o mejorado con respecto al menos una propiedad de la enzima.
- 25 Adicionalmente, en una exemplificación no limitante, una adición puede comprender una adición en el extremo amino o carboxi terminal de la proteína o alternativamente entre los sitios terminales, donde el cambio es no inhibidor o silencioso o mejorado con respecto al menos una propiedad de la enzima.
- 30 En otra exemplificación particular no limitante, un cambio puede comprender una pluralidad de modificaciones, incluidas sustituciones, adiciones, delecciones, fusiones y/o truncamientos, en la enzima codificada por el polinucleótido de referencia (SEQ ID NO:1, de manera que, con independencia de los efectos de las modificaciones individuales, cuando se tomen juntas como un conjunto, el efecto de las modificaciones sea no inhibidor o silencioso o mejorado con respecto al menos una propiedad de la enzima.
- 35 La mayoría de las variantes altamente preferidas son las variantes que conservan sustancialmente la misma función biológica y actividad que el polipéptido de referencia del que varía.
- El término “variante” hace referencia a polinucleótidos o polipéptidos de la invención modificados en uno o más 40 pares de bases, codones, intrones, exones, o residuos de aminoácidos (respectivamente) que todavía conservan la actividad biológica de una fitasa de la invención. Las variantes se pueden producir mediante cualquier número de medios incluidos métodos tales como, por ejemplo, PCR propensa a error, barajado, mutagénesis dirigida por oligonucleótidos, PCR de ensamblaje, mutagénesis sexual por PCR, mutagénesis *in vivo*, mutagénesis por cassetes, mutagénesis de conjunto recursiva, mutagénesis de conjunto exponencial, mutagénesis de sitio específico, reensamblaje por ligación, 45 GS&M y cualquiera de sus combinaciones como se comenta más completamente más abajo.
- El polinucleótido que codifica el SEQ ID NO: 2 se aisló originalmente de ADN genómico recuperado de *Escherichia coli* B como se describe más abajo. Contiene un marco de lectura abierto que codifica una proteína de 432 residuos de aminoácidos.
- 50 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un polinucleótido aislado que codifica una enzima ilustrativa de la presente invención (SEQ ID NO: 8, mutado).
- La invención también proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican el polipéptido de fitasa 55 descrito antes. Estos ácidos nucleicos pueden contener secuencias de nucleótidos de origen natural, o secuencias que difieren de las de los ácidos nucleicos de origen natural que codifican las fitasas, pero codifican los mismos aminoácidos, debido a la degeneración del código genético. Los ácidos nucleicos de la invención pueden contener nucleótidos de ADN o ARN, o sus combinaciones o modificaciones.
- 60 El polinucleótido de la presente invención puede estar en forma de ADN cuyo ADN incluye ADNc, ADN genómico, y ADN sintético. El ADN puede ser bicatenario o monocatenario, y si es monocatenario puede ser la cadena codificante o la cadena no codificante (anti-sentido).
- El polinucleótido que codifica la enzima madura puede incluir, pero no está limitado a: sólo la secuencia codificante para la enzima madura; la secuencia codificante para la enzima madura y secuencias codificantes adicionales tales 65 como una secuencia líder o una secuencia de proproteína; la secuencia codificante para la enzima madura (y opcionalmente la secuencia codificante adicional) y secuencias no codificantes, tales como intrones o secuencias codificantes 5' y/o 3' de la secuencia codificante para la enzima madura.

ES 2 328 670 T3

El polinucleótido puede tener una secuencia codificante que es una variante alélica de origen natural de la secuencia codificante. Como es conocido en la técnica, una variante alélica es una forma alternativa de una secuencia de polinucleótidos que puede tener una sustitución, delección o adición de uno o más nucleótidos, que no altera sustancialmente la función de la enzima codificada.

5 Como se comenta en la presente memoria, las variantes se pueden producir mediante cualquier número de medios incluidos métodos tales como, por ejemplo, PCR propensa a error, barajado, mutagénesis dirigida por oligonucleótidos, PCR de ensamblaje, mutagénesis sexual por PCR, mutagénesis *in vivo*, mutagénesis por casetes, mutagénesis de conjunto recursiva, mutagénesis de conjunto exponencial, mutagénesis de sitio específico, reensamblaje por ligación, 10 GSSM y cualquiera de sus combinaciones.

15 Se puede utilizar un método no estocástico denominado reensamblaje de ligación sintética (SLR), que está algo relacionado con el barajado estocástico, salvo que los elementos esenciales del ácido nucleico no se barajan o concatenan o quimerizan al azar, pero en cambio se ensamblan no estocásticamente para crear variantes.

15 El método SLR no depende de la presencia de un alto nivel de homología entre los polinucleótidos que se van a barajar. El método se puede utilizar no estocásticamente para generar genotecas (o conjuntos) de moléculas progenie que comprenden por encima de 10^{100} quimeras diferentes. Posiblemente, el SLR se puede utilizar incluso para generar 20 genotecas que comprenden por encima de 10^{1000} quimeras progenie diferentes.

20 Un método no estocástico para producir un conjunto de moléculas de ácidos nucleicos químéricas finalizadas que tienen un orden de ensamblaje total que se elige mediante diseño comprende las etapas de generación mediante diseño de una pluralidad de elementos esenciales de ácidos nucleicos específicos que tienen extremos ligables mutuamente compatibles útiles, y ensamblaje de estos elementos esenciales de ácidos nucleicos, de manera que se logre un orden 25 de ensamblaje total diseñado.

30 Se considera que los extremos ligables mutuamente compatibles de los elementos esenciales del ácido nucleico que se va a ensamblar son "útiles" para este tipo de ensamblaje ordenado si posibilitan el acoplamiento de los elementos esenciales en órdenes predeterminados. De este modo, el orden de ensamblaje total en el que se pueden acoplar los 35 elementos esenciales del ácido nucleico es especificado por el diseño de los extremos ligables y, si se va a utilizar más de una etapa de ensamblaje, el orden de ensamblaje total en el que se pueden acoplar los elementos esenciales del ácido nucleico también está especificado por el orden sucesivo de la etapa o etapas de ensamblaje. Las piezas de construcción recocidas se pueden tratar con una enzima, tal como una ligasa (p. ej., ADN ligasa de T4) para lograr la unión covalente de las piezas de construcción.

35 El diseño de los elementos esenciales del ácido nucleico se puede obtener tras los análisis de las secuencias de un conjunto de moldes de ácido nucleico progenitores que sirve como base para producir un conjunto progenie de moléculas químéricas de ácido nucleico finalizadas. Estos moldes de ácido nucleico progenitores sirven de este modo 40 como una fuente de información de la secuencia que ayuda al diseño de los elementos esenciales de ácido nucleico que se van a mutagenizar, esto es quimerizados o barajados.

45 Las secuencias de una pluralidad de moldes de ácido nucleico progenitores se alinean con el fin de seleccionar uno o más puntos de demarcación, cuyos puntos de demarcación se pueden localizar en un área de homología. Los puntos de demarcación se pueden utilizar para delinear los límites de los elementos esenciales del ácido nucleico que se vaya a generar. De este modo, los puntos de demarcación identificados y seleccionados en las moléculas progenitoras sirven como puntos de quimerización potenciales en el ensamblaje de las moléculas progenie.

50 Típicamente un punto de demarcación útil es un área de homología (que comprende al menos una base nucleotídica homóloga) compartida por al menos dos moldes progenitores, pero el punto de demarcación puede ser un área de homología que es compartida por al menos la mitad de los moldes progenitores, al menos dos tercios de los moldes progenitores, al menos tres cuartas partes de los moldes progenitores, y preferiblemente casi todos los moldes progenitores. Incluso más preferiblemente un punto de demarcación todavía útil es un área de homología que es compartida por todos los moldes progenitores.

55 El procedimiento de ensamblaje por ligación se realiza exhaustivamente con el fin de generar una genoteca exhaustiva. En otras palabras, todas las combinaciones ordenadas posibles de los elementos esenciales del ácido nucleico están representadas en el conjunto de moléculas de ácidos nucleicos químéricas finalizadas. Al mismo tiempo, el orden de ensamblaje (*es decir* el orden de ensamblaje de cada elemento esencial en la secuencia 5' a 3' de cada ácido nucleico químérico finalizado) en cada combinación es mediante diseño (o no estocástico). Debido a la naturaleza no estocástica del método, se reduce enormemente la posibilidad de productos secundarios no deseados.

60 El procedimiento de ensamblaje por ligación se puede realizar sistemáticamente, por ejemplo con el fin de generar una genoteca compartimentada sistemáticamente, con compartimentos que pueden ser escrutados sistemáticamente, por ej., de uno en uno. A través del uso selectivo y juicioso de los elementos esenciales de los ácidos nucleicos específicos, unido al uso selectivo y juicioso de las reacciones de ensamblaje por etapas sucesivas, se puede lograr un diseño experimental en el que se elaboren conjuntos específicos de productos progenie en cada uno de los diversos recipientes de reacción. Esto permite realizar un examen y un procedimiento de escrutinio sistemáticos. De este modo, esto permite examinar un número potencialmente muy grande de moléculas progenie sistemáticamente en grupos más pequeños.

ES 2 328 670 T3

Debido a su capacidad para realizar quimerizaciones de una manera que es altamente flexible aunque también es exhaustiva y sistemática, particularmente cuando hay un bajo nivel de homología entre las moléculas progenitoras, el método proporciona la generación de una genoteca (o conjunto) que comprende un gran número de moléculas progenie. Debido a la naturaleza no estocástica del reensamblaje por ligación, las moléculas progenie generadas pueden 5 comprender una genoteca de moléculas de ácidos nucleicos químéricos finalizados que tienen un orden de ensamblaje total que se elige mediante diseño. En una realización concreta, tal genoteca generada comprende de más de 10^3 a más de 10^{1000} especies moleculares progenie diferentes.

Un conjunto de moléculas de ácidos nucleicos químéricos finalizados, producido como se ha descrito puede 10 comprender un polinucleótido que codifica un polipéptido. Este polinucleótido puede ser un gen, que puede ser un gen artificial. Alternativamente, este polinucleótido puede ser una ruta génica, que puede ser una ruta génica artificial. Se pueden incorporar uno o más genes artificiales a una ruta génica artificial, tal como una ruta operable en un organismo eucariótico (incluidas plantas).

15 En otra exemplificación, la naturaleza sintética de la etapa en la que se generan los elementos esenciales permite el diseño y la introducción de nucleótidos (por ej., uno o más nucleótidos, que pueden ser, por ejemplo, codones o intrones o secuencias reguladoras) que pueden ser eliminadas por último opcionalmente en un procedimiento *in vitro* (p. ej., mediante mutagénesis) o en un procedimiento *in vivo* (por ej., utilizando la capacidad de empalme del gen de un organismo anfitrión). Se aprecia que en muchos casos puede ser también deseable la introducción de estos nucleótidos 20 por muchas otras razones además del beneficio potencial de crear un punto de demarcación útil.

Un elemento esencial de ácido nucleico se puede utilizar para introducir un intrón. De este modo, se pueden 25 introducir intrones funcionales en un gen artificial. Asimismo, se pueden introducir intrones funcionales en una ruta génica artificial. Es posible la generación de un polinucleótido químérico que es un gen artificial que contiene uno (o más) intrones introducidos artificialmente.

El método descrito también proporciona la generación de un polinucleótido químérico que es una ruta génica artificial que contiene uno (o más) intrones introducidos artificialmente. El intrón o los intrones introducidos artificialmente 30 pueden ser funcionales en una o más células anfitrionas para el empalme de genes sobre todo en el modo en el que los intrones de origen natural sirven funcionalmente en el empalme de genes. Es posible un procedimiento para producir polinucleótidos que contienen intrones artificiales para introducirlos en organismos anfitriones para su recombinación y/o empalme.

Un gen artificial producido también puede servir como sustrato para la recombinación con otro ácido nucleico. Así 35 mismo, una ruta génica artificial producida también puede servir como sustrato para la recombinación con otro ácido nucleico. La recombinación puede ser facilitada por, o producirse en, áreas de homología entre el gen que contiene el intrón artificial y un ácido nucleico que sirve como compañero de recombinación. El compañero de recombinación puede ser también un ácido nucleico generado mediante el método descrito, incluidos un gen artificial o una ruta génica artificial. La recombinación puede ser facilitada por o se puede producir en áreas de homología que existen en uno 40 (o más) intrones introducidos artificialmente en el gen artificial.

El método de reensamblaje por ligación sintética utiliza una pluralidad de elementos esenciales de ácidos nucleicos, cada uno de los cuales tiene preferiblemente dos extremos ligables. Los dos extremos ligables de cada elemento 45 esencial de ácido nucleico pueden ser dos extremos romos (es decir teniendo cada uno un saliente de cero nucleótidos), o preferiblemente un extremo romo y uno saliente, o aún más preferiblemente dos salientes.

Un saliente útil para este propósito puede ser un saliente 3' o un saliente 5'. De este modo, un elemento esencial 50 del ácido nucleico puede tener un saliente 3' o alternativamente un saliente 5' o alternativamente dos salientes 3' o alternativamente dos salientes 5'. El orden global en el que los elementos esenciales de los ácidos nucleicos se ensamblan para formar una molécula químérica de ácido nucleico finalizada se determina mediante diseño experimental intencionado y no es al azar.

Un elemento esencial de ácido nucleico se genera mediante síntesis química de dos ácidos nucleicos monocatenarios (referidos también como oligos monocatenarios) y poniéndolos en contacto de manera que se les permita hibridar 55 para formar un elemento esencial de ácido nucleico bicatenario.

Un elemento esencial de ácido nucleico monocatenario puede tener un tamaño variable. Los tamaños de estos 60 elementos esenciales pueden ser pequeños o grandes. Los tamaños preferidos para el elemento esencial oscilan de 1 par de bases (sin incluir ningún saliente) a 100.000 pares de bases (sin incluir ningún saliente). También se proporcionan otros intervalos de tamaño preferidos, que tienen límites inferiores de 1 pb a 10.000 pb (incluido cada valor entero intermedio), y límites superiores de 2 pb a 100.000 pb (incluido cada valor entero intermedio).

Existen muchos métodos mediante los cuales se puede generar un elemento esencial de ácido nucleico bicatenario que es útil; y estos son conocidos en la técnica y pueden ser realizados fácilmente por los expertos en la técnica.

65 Un elemento esencial de ácido nucleico bicatenario se puede generar generando primero dos ácidos nucleicos monocatenarios y permitiéndoles hibridar para formar un elemento esencial de ácido nucleico bicatenario. Las dos cadenas de un elemento esencial de ácido nucleico bicatenario pueden ser complementarias en cada nucleótido aparte

ES 2 328 670 T3

de cualquiera que forme un saliente; no conteniendo de este modo emparejamientos erróneos, aparte de cualquier saliente. Las dos cadenas de un elemento esencial de ácido nucleico bicanalario pueden ser complementarias en menos que todos los nucleótidos aparte de cualquiera que forme un saliente. De este modo, un elemento esencial de ácido nucleico bicanalario se puede utilizar para introducir degeneración del codón. Preferiblemente la degeneración del 5 codón se introduce utilizando la mutagénesis de saturación del sitio descrita en la presente memoria, utilizando uno o más casetes N, N, G/T o alternativamente utilizando uno o más casetes N,N,N.

El método de recombinación *in vivo* se puede realizar a ciegas sobre un conjunto de híbridos o alelos desconocidos de un polinucleótido o secuencia específicos. Sin embargo, no es necesario conocer la secuencia de ADN o ARN real 10 del polinucleótido específico.

El enfoque de la utilización de recombinación en una población mixta de genes puede ser útil para la generación de cualquier proteína útil, por ejemplo, interleuquina I, anticuerpos, tPA y hormona de crecimiento. Este enfoque se puede utilizar para generar proteínas que tienen especificidad o actividad alterada. El enfoque puede ser útil también para la 15 generación de secuencias híbridas de ácidos nucleicos, por ejemplo, regiones promotoras, intrones, exones, secuencias intensificadoras, regiones no traducidas 3' o regiones no traducidas 5' de genes. De este modo este enfoque se puede utilizar para generar genes que tienen aumento de las tasas de expresión. Este enfoque puede ser útil también en el estudio de secuencias de ADN repetitivas. Finalmente, este enfoque puede ser útil para mutar ribozimas o aptámeros.

20 Las variantes de los polinucleótidos y polipéptidos descritos en la presente memoria se pueden obtener mediante el uso de ciclos repetidos de reordenamiento reductivo, recombinación y selección que permiten la evolución molecular dirigida de secuencias lineales altamente complejas, tales como ADN, ARN o proteínas a través de recombinación.

El barajado de moléculas *in vivo* es útil para proporcionar variantes y se puede realizar utilizando la propiedad 25 natural de las células para recombinar multímeros. Si bien la recombinación *in vivo* ha proporcionado la ruta natural principal hacia la diversidad molecular, la recombinación genética permanece como un procedimiento relativamente complejo que implica 1) el reconocimiento de homologías; 2) la escisión de la cadena, la invasión de la cadena, y etapas metabólicas que conducen a la producción de quiasmas recombinantes, y finalmente 3) la resolución de los 30 quiasma en moléculas recombinadas discretas. La formación del quiasma requiere el reconocimiento de secuencias homólogas.

Se puede utilizar un método para producir un polinucleótido híbrido a partir de al menos un primer polinucleótido y un segundo polinucleótido para producir un polinucleótido híbrido introduciendo al menos un primer polinucleótido y un segundo polinucleótido que comparten al menos una región con homología parcial de la secuencia en una célula 35 anfítriona adecuada. Las regiones con homología parcial de la secuencia promueven procedimientos que dan como resultado la reorganización de la secuencia produciendo un polinucleótido híbrido. El término "polinucleótido híbrido", según se utiliza en la presente memoria, es cualquier secuencia de nucleótidos que resulte del método y contenga la secuencia de al menos dos secuencias de polinucleótidos originales. Tales polinucleótidos híbridos pueden resultar de 40 eventos de recombinación intermolecular que promueven la integración de la secuencia entre moléculas de ADN. Además, tales polinucleótidos híbridos pueden resultar de procedimientos de reordenamiento reductivo intramoleculares que utilizan secuencias repetidas para alterar una secuencia de nucleótidos en una molécula de ADN.

El método proporciona un medio para generar polinucleótidos híbridos que pueden codificar polipéptidos híbridos biológicamente activos (p. ej., una fitasa híbrida). Los polinucleótidos originales pueden codificar polipéptidos biológicamente activos. El método produce nuevos polipéptidos híbridos utilizando procedimientos celulares que integran la secuencia de los polinucleótidos originales de manera que el polinucleótido híbrido resultante codifica un polipéptido que demuestra actividades derivadas de los polipéptidos biológicamente activos originales. Por ejemplo, los polinucleótidos originales pueden codificar una enzima concreta a partir de microorganismos diferentes. Una enzima codificada por un primer polinucleótido de un organismo o variante puede, por ejemplo, funcionar eficazmente en unas 50 condiciones medioambientales concretas, p. ej., alta salinidad. Una enzima codificada por un segundo polinucleótido de un organismo o variante diferente puede funcionar eficazmente en condiciones medioambientales diferentes, tales como temperaturas extremadamente altas. Un polinucleótido híbrido que contiene secuencias del primer y segundo polinucleótidos originales puede codificar una enzima que exhibe características de ambas enzimas codificadas por los polinucleótidos originales. De este modo, la enzima codificada por el polinucleótido híbrido puede funcionar eficazmente en las condiciones medioambientales compartidas por cada una de las enzimas codificadas por el primer y segundo polinucleótidos, p. ej., alta salinidad y temperaturas extremas.

Las enzimas codificadas por los polinucleótidos originales incluyen, pero no están limitadas a, las fitasas. Un polipéptido híbrido puede exhibir una actividad enzimática especializada no desplegada en las enzimas originales. 60 Por ejemplo, después de la recombinación y/o el reordenamiento reductivo de los polinucleótidos que codifican las actividades hidrolasa, se puede escrutar el polipéptido híbrido resultante codificado por un polinucleótido híbrido en busca de actividades hidrolasa especializadas obtenidas a partir de cada una de las enzimas originales, es decir, el tipo de enlace sobre el que actúa la hidrolasa y la temperatura a la que funciona la hidrolasa. De este modo, por ejemplo, se puede escrutar la hidrolasa para averiguar las funcionalidades químicas que distinguen la hidrolasa híbrida 65 de las hidrolasas originales, tales como: (a) amida (enlaces peptídicos), es decir, proteasas; (b) enlaces éster, es decir, esterasas y lipasas; (c) acetales, es decir, glucosidasas y, por ejemplo, la temperatura, pH o concentración salina a la cual funciona el polipéptido híbrido.

ES 2 328 670 T3

Las fuentes de los polinucleótidos originales se pueden aislar de organismos individuales (“productos aislados”), colecciones de organismos que se han desarrollado en medios definidos (“cultivos de enriquecimiento”), u, organismos no cultivados (“muestras medioambientales”). El uso de un enfoque independiente del cultivo para obtener polinucleótidos que codifican actividades biológicas novedosas a partir de muestras medioambientales es muy preferible puesto 5 que permite acceder a recursos de biodiversidad sin explotar.

Las “genotecas medioambientales” se generan a partir de muestras medioambientales y representan los genomas colectivos de los organismos de origen natural archivados en vectores de clonación que se pueden propagar en anfitriones procarióticos adecuados. Puesto que el ADN clonado es extraído inicialmente directamente de las muestras 10 medioambientales, las genotecas no están limitadas a la pequeña fracción de procariotas que se pueden desarrollar en un cultivo puro. Adicionalmente, una normalización del ADN medioambiental presente en estas muestras podría permitir una representación mas igual del ADN de todas las especies presentes en la muestra original. Esto puede aumentar espectacularmente la eficacia de la búsqueda de genes interesantes a partir de constituyentes mínimos de la muestra que pueden estar infrarepresentados en varios órdenes de magnitud en comparación con las especies dominantes. 15

Por ejemplo, se escrutan bibliotecas génicas generadas a partir de uno o más microorganismos no cultivados en busca de una actividad de interés. Las rutas potenciales que codifican las moléculas bioactivas de interés se capturan primero en células procarióticas en forma de bibliotecas de expresión génica. Los polinucleótidos que codifican las 20 actividades de interés se aíslan de tales genotecas y se introducen en una célula anfitriona. La célula anfitriona se desarrolla en condiciones que promueven la recombinación y/o el reordenamiento reductivo creando biomoléculas potencialmente activas con actividades novedosas o potenciadas.

Los microorganismos a partir de los que se puede preparar el polinucleótido incluyen microorganismos procarióticos, tales como *Xanthobacter*, *Eubacteria* y *Archaeabacteria*, y microorganismos eucarióticos inferiores tales como hongos, algunas algas y protozoos. Los polinucleótidos se pueden aislar a partir de muestras medioambientales en cuyo caso el ácido nucleico se puede recuperar sin el cultivo de un organismo o recuperar de uno o más organismos cultivados. En un aspecto, tales microorganismos pueden ser extremófilos, tales como hipertermófilos, psicrófilos, psicrótrofos, halófilos, barófilos y acidófilos. Los polinucleótidos que codifican enzimas aisladas de microorganismos 25 extremófilos son particularmente preferidos. Tales enzimas pueden funcionar a temperaturas por encima de 100°C en manantiales calientes terrestres y en aberturas termales de profundidades marinas, a temperaturas por debajo de 0°C en aguas árticas, en el entorno salino saturado del Mar Muerto, a valores de pH alrededor de 0 en depósitos de carbón y en manantiales geotérmicos ricos en azufre, o a valores de pH superiores a 11 en sedimentos de aguas residuales. Por 30 ejemplo, algunas esterasas y lipasas clonadas y expresadas en organismos extremófilos muestran una alta actividad a lo largo de un amplio intervalo de temperaturas y pH.

Los polinucleótidos seleccionados y aislados como se ha descrito antes en la presente memoria se introducen en una célula anfitriona adecuada. Una célula anfitriona adecuada es cualquier célula que es capaz de promover la recombinación y/o el reordenamiento reductivo. Los polinucleótidos seleccionados ya están preferiblemente en un 40 vector que incluye las secuencias de control apropiadas. La célula anfitriona puede ser una célula eucariótica superior, tal como una célula de mamífero, o una célula eucariótica inferior, tal como una célula de levadura, o preferiblemente, la célula anfitriona puede ser una célula procariótica, tal como una célula bacteriana. La introducción del constructo en la célula anfitriona se puede efectuar mediante transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-Dextrano, o electroporación (Davis *et al.*, 1986).

Como ejemplos representativos de los anfitriones apropiados, se pueden mencionar: células bacterianas, tales como *E. coli*, *Streptomyces*, *Salmonella typhimurium*; células fúngicas, tales como levadura; células de insecto tales como S2 de *Drosophila* y Sf9 de *Spodoptera*; células animales tales como CHO, COS o melanoma de Bowes; adenovirus; y células vegetales. Se considera que la selección de un anfitrón apropiado se encuentra dentro del alcance de los 45 expertos en la técnica a partir de las enseñanzas de la presente memoria.

Con referencias concretas a los diferentes sistemas de cultivo de células de mamífero que se pueden emplear para expresar la proteína recombinante, los ejemplos de los sistemas de expresión en mamíferos incluyen las líneas de fibroblastos de riñón de mono COS-7, descritas en “SV40-transformed simian cells support the replication of early 55 SV40 mutants” (Gluzman, 1981), y otras líneas celulares capaces de expresar un vector compatible, por ejemplo, las líneas celulares C127, 3T3, CHO, HeLa y BHK. Los vectores de expresión en mamíferos comprenderán un origen de replicación, un promotor e intensificador adecuados, y también sitios de unión al ribosoma necesarios cualesquiera, un sitio de poliadenilación, y sitios donadores y aceptores de empalme, secuencias de terminación transcripcionales, y secuencias no transcritas limítrofes 5'. Las secuencias de ADN derivadas del empalme de SV40, y los sitios de 60 poliadenilación se pueden utilizar para proporcionar los elementos genéticos no transcritos requeridos.

Las células anfitrionas que contienen los polinucleótidos de interés se pueden cultivar en medios nutriente convencionales modificados según sea apropiado para activar los promotores, seleccionar los transformantes o amplificar los genes. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH y similares, son los utilizados previamente con la 65 célula anfitriona seleccionada en cuanto a la expresión, y resultará evidente para los expertos en la técnica. Los clones que se identifican por tener la actividad enzimática especificada pueden ser secuenciados después para identificar la secuencia de polinucleótidos que codifica una enzima que tiene la actividad intensificada.

Los métodos se pueden utilizar para generar polinucleótidos novedosos que codifican rutas bioquímicas a partir de uno o más operones o agrupaciones génicas o de sus porciones. Por ejemplo, las bacterias y muchos eucariotas tienen un mecanismo coordinado para regular los genes cuyos productos están implicados en procedimientos relacionados. Los genes son agrupados, en estructuras referidas como "agrupamientos génicos", en un solo cromosoma o inmediatamente adyacentes entre sí y se transcriben juntos bajo el control de una sola secuencia reguladora, incluyendo un solo promotor que inicia la transcripción del agrupamiento completo. De este modo, un agrupamiento genético es un grupo de genes adyacentes que son casi idénticos o están relacionados, usualmente en cuanto a su función. Un ejemplo de una ruta bioquímica codificada por los agrupamientos génicos son los policétidos. Los policétidos son moléculas

5 que son una fuente extremadamente rica de actividades biológicas, incluidos antibióticos (tales como las tetraciclinas y la eritromicina), agentes anticancerosos (daunomicina), inmunosupresores (FK506 y rapamicina), y productos veterinarios (monensina). Muchos policétidos (producidos por policétido sintetasas) son valiosos como agentes terapéuticos. Las policétido sintetasas son enzimas multifuncionales que catalizan la biosíntesis de una enorme variedad de cadenas carbonadas que difieren en longitud y patrones de funcionalidad y ciclación. Los genes de las policétido sintetasas corresponden a los agrupamientos génicos y al menos un tipo (denominado tipo I) de policétido sintetasas tienen genes y enzimas de gran tamaño, complicando la manipulación genética y los estudios *in vitro* de estos genes/proteínas.

10 El ADN del agrupamiento genético se puede aislar de diferentes organismos y ligar en vectores, particularmente vectores que contienen secuencias reguladoras de la expresión que pueden controlar y regular la producción de una actividad detectable de proteína o matriz relacionada con proteína de los agrupamientos génicos ligados. El uso de vectores que tienen una capacidad excepcionalmente grande para la introducción de ADN exógeno es particularmente apropiada para su uso con tales agrupamientos génicos y se describen a modo de ejemplo en la presente memoria para incluir el factor f (o factor de fertilidad) de *E. coli*. Este factor f de *E. coli* es un plásmido que afecta a su transferencia de alta frecuencia durante la conjugación y es ideal para lograr y propagar establemente grandes fragmentos de ADN, 15 tales como los agrupamientos génicos de muestras microbianas mixtas. Una vez ligados en un vector apropiado, dos o más vectores que contienen diferentes agrupamientos génicos de fitasa se pueden introducir en una célula anfitriona adecuada. Las regiones con homología de secuencia parcial compartida por los agrupamientos génicos promoverán procedimientos que dan como resultado la reorganización de la secuencia dando como resultado un agrupamiento genético híbrido. El agrupamiento genético híbrido novedoso se puede escrutar después en busca de aumentos de actividades 20 no encontrados en los agrupamientos génicos originales.

30 Un método para producir un polipéptido híbrido biológicamente activo y escrutar tal polipéptido en busca de aumento de actividad incluye:

- 35 1. 1) introducir al menos un primer polinucleótido conectado operablemente y un segundo polinucleótido conectado operablemente, compartiendo dichos al menos primer polinucleótido y segundo polinucleótido como mínimo una región con homología parcial de secuencia, en una célula anfitriona adecuada;
- 40 2. 2) hacer crecer la célula anfitriona en condiciones que promuevan la reorganización de la secuencia dando como resultado un polinucleótido híbrido conectado operablemente;
- 45 3. 3) expresar un polipéptido híbrido codificado por el polinucleótido híbrido;
4. 4) escrutar el polipéptido híbrido en condiciones que promuevan la identificación del aumento de actividad biológica; y
5. 5) aislar un polinucleótido que codifica el polipéptido híbrido.

50 Los métodos para escrutar diferentes actividades enzimáticas son conocidos por los expertos en la técnica y se comentan a lo largo de la memoria. Tales métodos se pueden emplear cuando se aíslan los polipéptidos y polinucleótidos de la invención.

Como ejemplos representativos de los vectores de expresión que se pueden utilizar se pueden mencionar las partículas virales, baculovirus, vectores de inserción o vectores de reemplazo del bacteriófago 1, fagos, plásmidos, fagémidos, cósmidos, fósmidos, cromosomas artificiales bacterianos (BAC), ADN viral (p. ej., vaccinia, adenovirus, virus de la viruela aviar, pseudorrabia y derivados de SV40), cromosomas artificiales basados en P1 (PAC), plásmidos de levaduras, cromosomas artificiales de levaduras (YAC), y cualquier otro vector específico para anfitriones específicos de interés (tales como *bacillus*, *aspergillus* y levadura). De este modo, por ejemplo, el ADN puede ser incluido en uno cualquiera de una variedad de vectores de expresión para expresar un polipéptido. Tales vectores incluyen secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintético. Se conoce un gran número de vectores adecuados que son conocidos por los expertos en la técnica, y son asequibles comercialmente. Los siguientes vectores se proporcionan a modo de ejemplo: Bacterianos: vectores pQE (Qiagen), plásmidos pBluescript, vectores pNH, vectores (lambda-ZAP (Stratagene); pTRC99a, pKK223-3, pDR540, pRIT2T (Pharmacia); Eucarióticos: pXT1, pSG5 (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG, pSVLSV40 (Pharmacia). Sin embargo, se puede utilizar cualquier otro plásmido u otro vector con tal que sea replicable y viable en el anfitrión. En la presente invención se pueden emplear vectores de bajo número de copias o de alto número de copias.

ES 2 328 670 T3

Un tipo preferido de vector para su uso en la presente invención contiene un origen de replicación con factor f. El factor f (o factor de fertilidad) en *E. coli* es un plásmido que efectúa su propia transferencia de alta frecuencia durante la conjugación y la transferencia menos frecuente del propio cromosoma bacteriano. Una realización particularmente preferida es la utilización de vectores de clonación, referidos como “fósmidos” o vectores de cromosomas artificiales bacterianos (BAC). Estos derivan del factor f de *E. coli* que es susceptible de integrar establemente grandes segmentos de ADN genómico. Cuando se integran con ADN de una muestra medioambiental no cultivada mixta, esto hace posible lograr grandes fragmentos genómicos en forma de una “genoteca de ADN medioambiental” estable.

Otro tipo de vector para su uso en la presente invención es un vector cosmídico. Los vectores cosmídicos fueron diseñados originalmente para clonar y propagar grandes segmentos de ADN genómico. La clonación en vectores cosmídicos se describe con detalle en “Molecular Cloning: A laboratory Manual” (Sambrook *et al.*, 1989).

La secuencia de ADN en el vector de expresión está conectada operativamente a una o varias secuencias de control de la expresión apropiadas (promotores) para dirigir la síntesis de ARN. Los promotores bacterianos nombrados concretos incluyen *lacI*, *lacZ*, *T3*, *T7*, *gpt*, *lambda P_R*, *P_L* y *trp*. Los promotores eucarióticos incluyen temprano inmediato de CMV, timidina quinasa de HSV, temprano y tardío de SV40, LTR de retrovirus, y metalotioneína-I de ratón. La selección del vector y promotor apropiados se encuentra en el nivel de los expertos normales en la técnica. El vector de expresión también contiene un sitio de unión al ribosoma para la iniciación de la traducción y un terminador de la transcripción. El vector también puede incluir secuencias apropiadas para amplificar la expresión. Las regiones promotoras se pueden seleccionar de cualquier gen deseado utilizando vectores CAT (cloranfenicol transferasa) u otros vectores con marcadores seleccionables. Además, los vectores de expresión contienen preferiblemente uno o más genes marcadores seleccionables para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de células anfitrionas transformadas tales como dihidrofolato reductasa o resistencia a la neomicina para el cultivo de células eucarióticas, o resistencia a la tetraciclina o la ampicilina en *E. coli*.

El reordenamiento *in vivo* está enfocado a procedimientos “inter-moleculares” referidos colectivamente como “recombinación” que en bacterias, se observa generalmente como un fenómeno “dependiente de RecA”. La invención puede depender de los procedimientos de recombinación de una célula anfitriona para recombinar y reordenar secuencias, o de la capacidad de las células para mediar procedimientos reductivos para disminuir la complejidad de las secuencias casi repetidas en la célula mediante delección. Este procedimiento de “reordenamiento reductivo” se produce mediante un procedimiento “intra-molecular”, independiente de RecA.

Los polinucleótidos variantes se pueden generar mediante el procedimiento de reordenamiento reductivo. El método implica la generación de constructos que contienen secuencias consecutivas (secuencias que codifican originales), su inserción en un vector apropiado, y su posterior introducción en una célula anfitriona apropiada. El reordenamiento de las identidades moleculares individuales se produce mediante procedimientos combinatorios entre las secuencias consecutivas en el constructo que posee regiones de homología, o entre las unidades casi repetidas. El procedimiento de reordenamiento recomienda y/o reduce la complejidad y la extensión de las secuencias repetidas, y da como resultado la producción de especies moleculares novedosas. Se pueden aplicar diferentes tratamientos para aumentar la tasa de reordenamiento. Éstos podrían incluir el tratamiento con luz ultravioleta, o productos químicos que dañan el ADN, y/o el uso de líneas de células anfitrionas que presentan niveles de “inestabilidad genética”. De este modo el procedimiento de reordenamiento puede implicar la recombinación homóloga o la propiedad natural de las secuencias casi repetidas para dirigir su propia evolución.

Las secuencias repetidas o “casi repetidas” juegan un papel en la inestabilidad genética. Las “casi repeticiones” son repeticiones que no están restringidas a su estructura unitaria original. Las unidades casi repetidas se pueden presentar en forma de una matriz de secuencias en un constructo; unidades consecutivas de secuencias similares. Una vez ligadas, los empalmes entre las secuencias consecutivas se vuelven esencialmente invisibles y la naturaleza casi repetitiva del constructo resultante es ahora continua a nivel molecular. La delección transforma las respuestas de la célula reduciendo la complejidad de funcionamiento del constructo resultante entre las secuencias casi repetidas. Las unidades casi repetidas proporcionan un repertorio prácticamente ilimitado de moldes después de que puedan ocurrir eventos de desfase. Los constructos que contienen las casi repeticiones proporcionan eficazmente de este modo suficiente elasticidad molecular para que puedan producirse eventos de delección (y potencialmente inserción) virtualmente en cualquier parte de las unidades casi repetitivas.

Las secuencias casi repetidas se ligan todas en la misma orientación, por ejemplo cabeza-cola o viceversa, la célula no puede distinguir unidades individuales. Por consiguiente, el procedimiento reductivo se puede producir en la totalidad de las secuencias. En contraste, cuando por ejemplo, las unidades se presentan cabeza-cabeza, en lugar de cabeza-cola, la inversión delinea los puntos finales de la unidad adyacente de manera que la formación de la delección favorecerá la pérdida de unidades discretas. De este modo, es preferible con el presente método que las secuencias estén en la misma orientación. La orientación al azar de las secuencias casi repetidas dará como resultado la pérdida de eficacia del reordenamiento, mientras que la consecuente orientación de las secuencias ofrecerá la mayor eficacia. Sin embargo, aunque tener menos secuencias contiguas en la misma orientación disminuye la eficacia, todavía puede proporcionar la suficiente elasticidad para la recuperación eficaz de las moléculas novedosas. Se pueden elaborar constructos con las secuencias casi repetidas en la misma orientación para permitir una mayor eficacia.

ES 2 328 670 T3

Las secuencias se pueden ensamblar en una orientación cabeza-cola utilizando cualquiera de una variedad de métodos, incluidos los siguientes:

- 5 1. a) Se pueden utilizar cebadores que incluyen una cabeza de poli-A y una cola de poli-T que cuando se convierten en monocatenarios proporcionarían orientación. Esto se podría lograr habiendo elaborado las primeras pocas bases de los cebadores a partir de ARN y por tanto fácilmente separadas por la ARNasaH.
- 10 2. b) Se pueden utilizar cebadores que incluyen sitios de escisión únicos mediante restricción. Se requerirían sitios múltiples, una batería de secuencias únicas, y etapas de síntesis y ligación repetidas.
3. c) Las pocas bases internas del cebador podrían ser tioladas y utilizar una exonucleasa para producir moléculas con la cola apropiada.

La recuperación de las secuencias reordenadas depende de la identificación de vectores de clonación con un IR reducido. Las secuencias codificantes reordenadas se pueden recuperar después mediante amplificación. Los productos se vuelven a clonar y se expresan. La recuperación de los vectores de clonación con un IR reducido se puede efectuar mediante:

- 20 1. 1) El uso de vectores sólo mantenidos establemente cuando el constructo tiene una complejidad reducida.
2. 2) La recuperación física de los vectores acortados mediante procedimientos físicos. En este caso, se podría recuperar el vector de clonación utilizando procedimientos de aislamiento de plásmidos convencionales y fraccionar por tamaños en un gel de agarosa gel, o columnas con un corte de bajo peso molecular utilizando procedimientos convencionales.
- 25 3. 3) La recuperación de vectores que contienen genes interrumpidos que se pueden seleccionar cuando disminuye el tamaño del inserto.
4. 4) El uso de técnicas de selección directa con un vector de expresión y la selección apropiada.

30 Las secuencias codificantes (por ejemplo, genes) de organismos relacionados pueden demostrar un alto grado de homología y codifican productos proteicos bastante diversos. Estos tipos de secuencias son particularmente útiles en la presente invención como casi repeticiones. Sin embargo, si bien los ejemplos ilustrados más abajo demuestran el reordenamiento de las secuencias codificantes originales casi idénticas (casi repeticiones), este procedimiento no está limitado a tales repeticiones casi idénticas.

40 El siguiente ejemplo demuestra semejante método. Se representan secuencias de ácido nucleico codificantes (casi repeticiones) derivadas de tres (3) especies únicas. Cada secuencia codifica una proteína con un conjunto distinto de propiedades. Cada una de las secuencias difiere en un único o unos pocos pares de bases en una única posición de la secuencia que se denominan "A", "B" y "C". Las secuencias casi repetidas son amplificadas por separado o colectivamente y ligadas en ensamblajes al azar de manera que se encuentran disponibles todas las posibles permutaciones y combinaciones en la población de moléculas ligadas. El número de unidades casi repetidas se puede controlar por medio de las condiciones de ensamblaje. El número medio de unidades casi repetidas en un constructo se define como el índice repetitivo (IR).

45 Una vez formados, los constructos pueden, o no ser fraccionados por tamaños sobre gel de agarosa de acuerdo con los protocolos publicados, insertados en un vector de clonación, y transfecados a una célula anfitriona apropiada. Después las células se propagan y se efectúa el "reordenamiento reductivo". Se puede estimular la velocidad del procedimiento de reordenamiento reductivo mediante la introducción de daños en el ADN si se desea. Que la reducción en el IR esté mediada por la formación de delecciones entre secuencias repetidas por un mecanismo "intramolecular", o esté mediada por eventos de tipo recombinación a través de mecanismos "inter-moleculares" es irrelevante. El resultado final es un reordenamiento de las moléculas en todas las posibles combinaciones.

55 Opcionalmente, el método comprende la etapa adicional de escrutar los miembros de la genoteca de la reserva barajada para identificar los miembros individuales de la genoteca barajada que tienen la capacidad de unirse o interaccionar de otro modo, o catalizar una reacción concreta (p. ej., como la catálisis de la hidrólisis de un haloalcano).

60 Los polipéptidos que se identifican a partir de tales genotecas se pueden utilizar para fines terapéuticos, diagnósticos, de búsqueda y propósitos relacionados (p. ej., catalizadores, solutos para incrementar la osmolaridad de una solución acuosa, y similares), y/o se pueden someter a uno o más ciclos adicionales de barajado y/o selección.

65 Antes de o durante la recombinación o el reordenamiento, los polinucleótidos generados mediante el método descrito en la presente memoria se pueden someter a agentes o procedimientos que promueven la introducción de mutaciones en los polinucleótidos originales. La introducción de tales mutaciones incrementaría la diversidad de los híbridos polinucleotídicos resultantes y los polipéptidos codificados a partir de ellos. Los agentes o procedimientos que promueven la mutagénesis pueden incluir, pero no están limitados a: (+)-CC-1065, o un análogo sintético tal como (+)-CC-1065- (N3-Adenina, véase Sun y Hurley, 1992); un aducto de 4'-fluoro-4-aminobifenilo N-acetilado o desace-

ES 2 328 670 T3

tilado capaz de inhibir la síntesis de ADN (véase, por ejemplo, van de Poll *et al.*, 1992); o un aducto de 4-aminobifenilo N-acetilado o desacetilado capaz de inhibir la síntesis de ADN (véase también, van de Poll *et al.*, 1992, págs. 751-758); cromo trivalente, una sal de cromo trivalente, un aducto de ADN hidrocarbonado aromático policíclico (“PAH”) capaz de inhibir la replicación del ADN, tal como 7-bromometil-benz[a]antraceno (“BMA”), tris(2,3-dibromopropil)

- 5 fosfato (“Tris-BP”), 1,2-dibromo-3-cloropropano (“DBCP”), 2-bromoacroleína (2BA), benzo[a]pireno-7,8-dihidrodiol-9-10-epoxido (“BPDE”), una sal de halógeno de platino(II), N-hidroxi-2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]-quinolina (“N-hidroxi-IQ”), y N-hidroxi-2-amino-1-metil-6-fenilimidazo- [4,5-f]-piridina (“N-hidroxi-PhIP”). Los métodos especialmente preferidos para ralentizar o detener la amplificación por PCR consisten en luz ultravioleta (+)-CC-1065 y (+)-CC-1065- (N3-Adenina). Los métodos particularmente preferidos son los ductos de ADN o los polinucleótidos 10 que comprenden los aductos de ADN de los polinucleótidos o las reservas de polinucleótidos, que pueden ser liberados o separados mediante un procedimiento que incluye el calentamiento de la solución que comprende los polinucleótidos antes del procesamiento adicional.

15 Un método de producción de recombinantes proteicos que tienen actividad biológica implica tratar una muestra que comprende polinucleótidos molde de doble hebra que codifican una proteína de tipo salvaje en condiciones que proporcionan la producción de polinucleótidos híbridos o reorganizados.

20 Se pueden utilizar cebadores de codones patentados (que contienen una secuencia N,N,N degenerada) para introducir mutaciones puntuales en un polinucleótido, con el fin de generar un grupo de polipéptidos progenie en el que 25 está representado un intervalo completo de sustituciones de un único aminoácido en cada posición de aminoácidos (mutagénesis saturada del sitio génico (GSSM)). Los oligos utilizados están formados contiguamente por una primera secuencia homóloga, una secuencia N,N,N degenerada, y preferiblemente pero no necesariamente una segunda secuencia homóloga. Los productos traduccionales de la progenie aguas abajo del uso de tales oligos incluyen todos los posibles cambios de aminoácidos en cada sitio de aminoácido a lo largo del polipéptido, debido a que la degeneración 25 de la secuencia N,N,N incluye codones para los 20 aminoácidos.

30 Uno de tales oligos degenerados (formado por una casete degenerada N,N,G/T) se utiliza para someter cada codón original de un molde polinucleotídico parental a una gama completa de sustituciones de codones. Alternativamente, se utilizan al menos dos cassetes N,N,G/T degeneradas en el mismo oligo o no, para someter al menos dos codones originales de un molde polinucleotídico parental a una gama completa de sustituciones de codones. De este modo, más de una secuencia N,N,G/T puede estar contenida en un oligo para introducir mutaciones de aminoácidos en más de un sitio. Esta pluralidad de secuencias N,N,G/T puede ser directamente contigua, o separada por una o más secuencias de nucleótidos adicionales. Los oligos útiles para introducir adiciones y delecciones se pueden utilizar solos o combinados con los codones que contienen una secuencia N,N,G/T, para introducir cualquier combinación o 35 permutación de adiciones, delecciones, y/o sustituciones de aminoácidos.

En una exemplificación concreta, es posible mutagenizar dos o más posiciones de aminoácidos contiguas utilizando un oligo que contiene tripletes contiguos N,N,G/T, *es decir* una secuencia (N,N,G/T)_n degenerada.

40 Se pueden utilizar cassetes degeneradas que tienen una degeneración menor que la de la secuencia N,N,G/T. Por ejemplo, puede ser deseable en algunos casos utilizar (p. ej., en un oligo) una secuencia triplete degenerada que comprende sólo un N, donde dicho N puede estar en primera, segunda o tercera posición del triplete. Se puede utilizar cualquier otra base incluyendo cualquier combinación y permutación de las mismas en las dos posiciones restantes del triplete. Alternativamente, puede ser deseable en algunos casos utilizar (p. ej., en un oligo) una secuencia triplete 45 N,N,N degenerada, o una secuencia triplete N,N,G/C.

50 Se aprecia, no obstante, que el uso de un triplete degenerado (tal como una secuencia triplete N, N, G/T o N, N, G/C) es ventajosa por diversas razones. Esto proporciona medios para generar sistemáticamente y bastante fácilmente la sustitución de toda la gama de posibles aminoácidos (para un total de 20 aminoácidos) en todas y cada una de las 55 posiciones de aminoácidos de un polipéptido. De este modo, para un polipéptido de 100 aminoácidos se proporciona un modo de generar sistemáticamente y bastante fácilmente 2.000 especies distintas (es decir, 20 posibles aminoácidos por 100 posiciones de aminoácidos). Se aprecia que se proporcionan, por medio del uso de un oligo que contiene una secuencia triplete N, N, G/T o N, N, G/C degenerada, 32 secuencias individuales que codifican 20 posibles aminoácidos. De este modo, en un recipiente de reacción en el que una secuencia de polinucleótidos parental está sometida a mutagénesis de saturación utilizando uno de tales oligos, se generan 32 polinucleótidos progenie distintos que codifican 20 polipéptidos distintos. En contraste, el uso de un oligo no degenerado en la mutagénesis dirigida al sitio conduce solo a un polipéptido progenie producto por recipiente de reacción.

60 También se proporciona el uso de oligos no degenerados, que se pueden utilizar opcionalmente combinados con los cebadores degenerados descritos. Se aprecia que en algunas situaciones, resulta ventajoso utilizar oligos no degenerados para generar mutaciones puntuales específicas en un polinucleótido de trabajo. Esto proporciona un medio para generar mutaciones puntuales silenciosas específicas, mutaciones puntuales que conducen a los correspondientes cambios de aminoácido, y mutaciones puntuales que causan la generación de codones de terminación y la correspondiente expresión de fragmentos polipeptídicos.

65 De este modo, cada recipiente de reacción de mutagénesis de saturación puede contener polinucleótidos que codifican al menos 20 moléculas polipeptídicas progenie de manera que los 20 aminoácidos están representados en una posición de aminoácido específica correspondiente a la posición del codón mutagenizada en el polinucleótido parental.

ES 2 328 670 T3

Los polipéptidos progenie degenerados 32 veces generados a partir de cada recipiente de reacción de mutagénesis de saturación se pueden someter amplificación clónica (p. ej., clonados en un anfitrión *E. coli* adecuado utilizando un vector de expresión) y someter a un escrutinio de la expresión. Cuando un polipéptido progenie individual es identificado mediante escrutinio por presentar un cambio favorable en las propiedades (cuando se compara con el polipéptido parental), puede ser secuenciado para identificar la correspondiente sustitución de aminoácidos favorable contenida en él.

Se aprecia que tras mutagenizar todas y cada una de las posiciones de aminoácidos de un polipéptido parental utilizando la mutagénesis de saturación descrita en la presente memoria, se pueden identificar los cambios de aminoácidos favorables en más de una posición de aminoácido. Se pueden generar una o más moléculas progenie nuevas que contienen una combinación de todas o de parte de estas sustituciones de aminoácidos favorables. Por ejemplo, si se identifican 2 cambios de aminoácidos favorables específicos en cada una de las 3 posiciones de aminoácidos de un polipéptido, las permutaciones incluyen 3 posibilidades en cada posición (sin cambio con respecto al aminoácido original, y cada uno de los dos cambios favorables) y 3 posiciones. De este modo, existen $3 \times 3 \times 3 = 27$ posibilidades totales, incluyendo 7 que fueron examinadas previamente - 6 mutaciones puntuales individuales (es decir, 2 de cada una de las tres posiciones) y sin cambio en ninguna posición.

La mutagénesis de saturación del sitio se puede utilizar junto con el barajado, la quimerización, la recombinación y otros procedimientos de mutagénesis, junto con el escrutinio. Se puede utilizar cualquiera de los procedimientos de mutagénesis, incluyendo la mutagénesis de saturación, de una manera reiterativa. En una exemplificación, se emplea el uso iterativo de cualquier procedimiento mutagenizante combinado con el escrutinio.

De este modo, en una exemplificación no limitante, los polinucleótidos y polipéptidos de la invención se pueden obtener mediante mutagénesis de saturación combinada con procedimientos de mutagenización adicionales, tales como procedimientos en los que dos o más polinucleótidos afines son introducidos en una célula anfitriona adecuada de manera que se genere un polinucleótido híbrido mediante recombinación y reordenamiento reductivo.

Además de realizar la mutagénesis a lo largo de la secuencia completa de un gen, se puede utilizar la mutagénesis para remplazar cualquiera de las numerosas bases de una secuencia de polinucleótidos, donde el número de bases que se va a mutagenizar es preferiblemente cada número entero de 15 a 100.000. De este modo, en lugar de mutagenizar cada posición a lo largo de una molécula, se puede someter cada una o un número discreto de bases (preferiblemente un subgrupo que totaliza de 15 a 100.000) a mutagénesis. Preferiblemente, se utiliza un nucleótido separado para mutagenizar cada posición o grupo de posiciones a lo largo de una secuencia de polinucleótidos. Un grupo de 3 posiciones que se va a mutagenizar puede ser un codón. Las mutaciones son introducidas preferiblemente utilizando un cebador mutagénico, que contiene una casete heteróloga, también referida como casete mutagénica. Las cassetes preferidas pueden tener de 1 a 500 bases. Cada posición de nucleótido de semejantes cassetes heterólogas es N, A, C, G, T, A/C, A/G, A/T, C/G, C/T, G/T, C/G/T, A/G/T, A/C/T, A/C/G, o E, donde E es cualquier base que no sea A, C, G, o T (E puede ser referida como oligo diseñador).

En sentido general, la mutagénesis de saturación comprende mutagenizar un grupo completo de cassetes mutagénicas (donde cada casete tiene preferiblemente de aproximadamente 1-500 bases de longitud) en la secuencia de polinucleótidos definida que se va a mutagenizar (donde la secuencia que se va a mutagenizar tiene preferiblemente de aproximadamente 15 a 100.000 bases de longitud). De este modo, un grupo de mutaciones (que oscila de 1 a 100 mutaciones) es introducido en cada casete que va a ser mutagenizada. El agrupamiento de mutaciones que se va a introducir en una casete puede ser diferente o igual a un segundo agrupamiento de mutaciones que va a ser introducido en una segunda casete durante la aplicación de una ronda de mutagénesis de saturación. Tales agrupamientos son ilustrados por delecciones, adiciones, agrupamientos de codones concretos, y agrupamientos de cassetes de nucleótidos concretas.

Las secuencias definidas que se van a mutagenizar incluyen un gen completo, una ruta, un ADNc, un marco de lectura abierto completo (ORF), y un promotor completo, un intensificador, un represor/transactivador, un origen de replicación, un intrón, un operador, o cualquier grupo polinucleotídico funcional. Generalmente, una "secuencia definida" para este fin puede ser cualquier polinucleótido que tenga una secuencia de polinucleótidos de 15 bases, y secuencias de polinucleótidos de longitudes entre 15 bases y 15.000 bases (esta invención nombra específicamente cada número entero en medio). Las consideraciones de la elección de los agrupamientos de codones incluyen los tipos de aminoácidos codificados por una casete mutagénica degenerada.

Una exemplificación particularmente preferida de un agrupamiento de mutaciones que puede ser introducido en una casete mutagénica incluye sustituciones de codones degeneradas (utilizando oligos degenerados) que codifican 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, y 20 aminoácidos en cada posición. Una genoteca de polipéptidos es codificada de ese modo.

Los polinucleótidos pueden tener la secuencia codificante para la enzima madura fusionada en el mismo marco de lectura a una secuencia de polinucleótidos que ayuda a la expresión y secreción de una enzima a partir de una célula anfitriona, por ejemplo, una secuencia líder que funciona para controlar el transporte de una enzima desde la célula. Una enzima que tiene una secuencia líder es un ejemplo de una preproteína y puede tener la secuencia líder escindida por la célula anfitriona para formar la forma madura de la enzima. Los polinucleótidos también pueden codificar una proproteína que es ilustrada por una proteína madura más los restos aminoácido 5' adicionales. Una proteína madura

ES 2 328 670 T3

por lo demás que tiene una prosecuencia es ilustrada por una proproteína que es una forma inactiva de la proteína. Una vez que la prosecuencia es escindida queda una proteína madura activa.

De este modo, por ejemplo, el polinucleótido codifica una enzima madura, o una enzima que tiene tanto una prosecuencia como una presecuencia (p. ej. una secuencia líder).

Las secuencias codificantes para las enzimas fitasa fueron identificadas preparando ADN genómico de *E. coli* B, por ejemplo, y recuperando (a través, por ejemplo, de amplificación por PCR) a partir del ADN genómico, el ADN que codifica la actividad fitasa. Tales métodos para la recuperación son bien conocidos en la técnica. Un medio, por ejemplo, comprende diseñar los cebadores de amplificación para recuperar la secuencia codificante, amplificar el gen a partir del ADN genómico, subclonar el ADN en un vector, transformar el constructo resultante en una célula anfitriona, y expresar la enzima fitasa para su evaluación. Tales procedimientos son bien conocidos en la técnica y los métodos son proporcionados, por ejemplo, por Sambrook *et al.*, 1989.

Se aisló una enzima fitasa a partir de un ADN genómico de *E. coli* B mediante la siguiente técnica:

se obtuvo ADN genómico de *E. coli* B comercialmente (Sigma: Núm. de Catálogo D-2001, St. Louis, Nueva Jersey). Se utilizaron los siguientes cebadores para amplificar el gen directamente a partir del ADN genómico:

cebador 5' gtttctgaattcaaggaggaaatttaaATGAAAGCGATCTTAATCCCATT (SEQ ID NO: 3); y

cebador 3' gtttctggatccTTACAAACTGCACGCCGGTAT (SEQ ID NO: 4)

La polimerasa de Pfu se utilizó de acuerdo con el protocolo de los fabricantes (Stratagene Cloning Systems, Inc., La Jolla, CA).

El producto de la PCR y el vector pQE60 (Qiagen) fueron digeridos ambos con las endonucleasas de restricción EcoRI y BglII (New England Biolabs) de acuerdo con los protocolos de los fabricantes. La ligación y la transformación, y la expresión en células anfítrionas pREP4 M15 (Qiagen) proporcionan una proteína etiquetada con 6X-His C-terminal.

Después se pueden medir las secuencias de ácido nucleico y otras enzimas en cuanto a su retención de la actividad biológica característica para la enzima de la presente invención, por ejemplo, en un análisis para detectar la actividad enzimática fitasa (Food Chemicals Codex, 4^a Ed.). Tales enzimas incluyen las formas truncadas de la fitasa, y variantes tales como las variantes por delección e inserción.

Un ejemplo *in vitro* de semejante análisis es el siguiente análisis para la detección de la actividad fitasa: Se puede medir la actividad fitasa incubando 150 µl de la preparación de enzima con 600 µl de fitato sódico 2 mM en tampón Tris-HCl 100 mM pH 7,5, con un suplemento de CaCl₂ 1 mM durante 30 minutos a 37°C. Después de la incubación la reacción se detiene añadiendo 750 µl de ácido tricloroacético al 5%. El fosfato liberado se midió espectrofotométricamente frente al patrón fosfato a 700 nm después de añadir 1500 µl del reactivo de color (4 volúmenes de molibdato de amonio al 1,5% en ácido sulfúrico al 5,5% y 1 volumen de sulfato ferroso al 2,7%; Shimizu, 1992). Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima requerida para liberar un µmol de Pi por minuto en las condiciones del análisis. La actividad específica se puede expresar en unidades de actividad enzimática por mg de proteína.

La enzima de la presente invención tiene actividad enzimática con respecto a la hidrólisis de fitato a inositol y fosfato libre.

Las enzimas y polinucleótidos de la presente invención se proporcionan preferiblemente en forma aislada, y preferiblemente se purifican hasta la homogeneidad. El polipéptido de fitasa de la invención se puede obtener utilizando cualquiera de los numerosos métodos convencionales. Por ejemplo, se pueden producir polipéptidos de fitasa en un sistema de expresión recombinante convencional (véase más abajo), sintetizado químicamente (este enfoque puede estar limitado a fragmentos peptídicos de fitasa pequeños), o se pueden purificar a partir de organismos en los que son naturalmente expresados. Los métodos de expresión útiles incluyen el uso de anfítriones mamíferos, anfítriones microbianos, y anfítriones vegetales.

La expresión recombinante de las presentes moléculas de fitasa se puede llevar a cabo combinada con una o más moléculas adicionales tales como, por ejemplo, otras enzimas. Este enfoque es útil para producir productos combinados, tales como una planta o una parte de una planta que contiene las presentes moléculas de fitasa así como una o más moléculas adicionales - preferiblemente dichas moléculas de fitasa y dichas moléculas adicionales son útiles en un tratamiento combinado. Las moléculas expresadas recombinantemente resultantes se pueden utilizar en forma homogeneizada y/o purificada o alternativamente en una forma relativamente no purificada (p. ej. en forma de partes consumibles de plantas que son útiles cuando se mezclan con otros productos alimenticios para catalizar la degradación de fitato).

ES 2 328 670 T3

En síntesis, en una realización no limitante, la presente invención proporciona una enzima recombinante expresada en un anfitrión. En otra realización no limitante, la presente invención proporciona a enzima fitasa sustancialmente pura. De este modo, una enzima de la presente invención puede ser una enzima recombinante, una enzima natural, o una enzima sintética, preferiblemente una enzima recombinante.

5 La presente invención también se refiere a vectores que incluyen polinucleótidos de la presente invención, células anfítrionas que son diseñadas genéticamente con vectores de la invención, y a la producción de enzimas de la invención mediante técnicas recombinantes.

10 Las células anfítrionas son diseñadas genéticamente (p. ej. transducidas o transformadas o transfectadas) con los vectores que contienen los polinucleótidos de esta invención. Tales vectores pueden ser, por ejemplo, un vector de clonación o un vector de expresión. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de un plásmido, una partícula viral, un fago, un príón, etc. Las células anfítrionas diseñadas pueden ser cultivadas en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para activar los promotores, y/o seleccionar los transformantes o amplificar los 15 genes de la presente invención. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH y similares, son aquellos utilizados previamente con la célula anfítriona seleccionada para la expresión, y serán evidentes para los expertos en la técnica.

20 Los polinucleótidos de la presente invención se pueden emplear para producir enzimas mediante técnicas recombinantes. De este modo, por ejemplo, el polinucleótido puede ser incluido en cualquiera de una variedad de vectores de expresión para expresar una enzima. Tales vectores incluyen secuencias de ADN cromosómicas, no cromosómicas y sintéticas, p. ej., derivados de SV40; plásmidos bacterianos; ADN de fagos; baculovirus; plásmidos de levadura; vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fagos, ADN virales tales como vaccinia, adenovirus, virus de la viruela aviar, y pseudorrabia. Sin embargo, se puede utilizar cualquier otro vector con tal que sea replicable 25 y viable en el anfitrión.

30 La secuencia de ADN apropiada se puede insertar en el vector mediante una variedad de procedimientos. En general, la secuencia de ADN se inserta en uno o varios sitios de endonucleasas de restricción apropiadas mediante procedimientos conocidos en la técnica. En este significado se incluye el uso de moléculas de extremos romos que podrían ser generadas mediante el uso de la digestión con enzimas de restricción así como medios independientes 35 de la digestión con enzimas de restricción. Alternativamente, el inserto puede ser incorporado a un vector por medios denominados “independientes de ligasa”. En un aspecto particular, un medio “independiente de ligasa” se ilustra mediante el uso de la ligación mediada por topoisomerasa a la temperatura ambiente, por ejemplo de acuerdo con el kit disponible en el mercado denominado TOPO-TA Cloning® (Invitrogen Corporación, Carlsbad, CA). También 40 pueden resultar útiles enzimas alternativas, incluyendo isómeros de topoisomerasa así como enzimas de recombinación más distamente relacionadas (p. ej. recombinasas), para mediar este tipo de incorporación “independiente de ligasa”. En otro aspecto particular, un medio “independiente de ligasa” se ilustra mediante el uso de mecanismos de reparación del anfitrión. Se considera que tales procedimientos y otros están dentro del alcance de los expertos en la técnica.

45 La secuencia de ADN en el vector de expresión está conectada operativamente a una o varias secuencias de control de la expresión apropiadas (promotores) para dirigir la síntesis de ARNm. Como ejemplos representativos de tales promotores, se pueden mencionar: un promotor de LTR o SV40, un lac o trp de *E. coli*, un promotor P_L del fago lambda y otros promotores que se sabe que controlan la expresión de genes en células procarióticas o eucarióticas o sus virus. El vector de expresión también contiene un sitio de unión al ribosoma para el inicio de la traducción y un terminador de la transcripción. El vector también puede incluir secuencias apropiadas para amplificar la expresión.

50 Además, los vectores de expresión contienen preferiblemente uno o más genes marcadores seleccionables para proporcionar un rasgo típico para la selección de células anfítrionas transformadas tales como la dihidrofolato reduc-tasa o la resistencia a la neomicina para el cultivo de células eucarióticas, o tales como la resistencia a tetraciclina o 55 ampicilina en *E. coli*.

El vector que contiene la secuencia de ADN apropiada como se ha descrito aquí antes, así como un promotor o una secuencia de control apropiados, pueden ser empleados para transformar un anfitrión apropiado para permitir al anfitrión expresar la proteína.

60 Como ejemplos representativos de los anfítriones apropiados, se pueden mencionar: células bacterianas, tales como *E. coli*, *Streptomyces*, *Bacillus subtilis*; células fúngicas, tales como levaduras; células de insecto tales como *Drosophila S2* y *Spodoptera Sf9*; células de animales tales como CHO, COS o melanoma de Bowes; adenovirus; células vegetales, etc. Se considera que la selección de un anfítrion apropiado está dentro del alcance de los expertos en la técnica a partir de las ilustraciones de la presente memoria.

Más concretamente, la presente invención también incluye constructos recombinantes que comprenden una o más 65 de las secuencias ampliamente descritas antes. Los constructos comprenden un vector, tal como un plásmido o un vector viral, en el que se ha insertado una secuencia de la invención, en orientación directa o inversa. En un aspecto preferido de esta realización, el constructo comprende adicionalmente secuencias reguladoras, incluyendo, por ejemplo, un promotor, conectado operablemente a la secuencia. También se pueden incorporar uno o más insertos adicionales que conducen a la expresión de una o más moléculas adicionales, tales como otra fitasa o una enzima

ES 2 328 670 T3

proteasa, preferiblemente dichas una o más moléculas adicionales son útiles combinadas con la presente fitasa en un tratamiento combinado.

Los expertos en la técnica conocen un gran número de vectores y promotores adecuados, y son asequibles comercialmente.

5 Los "plásmidos" se designan por una p minúscula precedida y/o seguida de letras mayúsculas y/o números. Los plásmidos de partida de la presente memoria son asequibles comercialmente, asequibles al público sobre una base no restringida, o se pueden construir a partir de plásmidos asequibles de acuerdo con los procedimientos publicados. Además, los plásmidos equivalentes a los descritos son conocidos en la técnica y serán evidentes para el experto en la técnica.

10 Los siguientes vectores se proporcionan a modo de ejemplo; Bacterianos: pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen), pBluescript II (Stratagene); pTRC99a, pKK223-3, pDR540, pRIT2T (Pharmacia); Eucarióticos: pXT1, pSG5 (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG, pSVLSV40 (Pharmacia). Sin embargo, se puede utilizar cualquier otro plásmido u otro vector con tal que sean replicables y viables en el anfitrión.

15 Las regiones promotoras se pueden seleccionar a partir de cualquier gen deseado utilizando vectores de CAT (cloranfenicol transferasa) u otros vectores con marcadores seleccionables. Dos vectores apropiados son pKK232-8 y pCM7. Los promotores bacterianos nombrados concretos incluyen lacI, lacZ, T3, T7, gpt, lambda P_R, P_L y trp. Los promotores eucarióticos incluyen temprano inmediato de CMV, timidina quinasa de HSV, temprano y tardío de SV40, 20 LTR de retrovirus, y metalotioneína-I de ratón. La selección del vector y el promotor apropiados están al alcance de los expertos normales en la técnica.

25 En una realización adicional, la presente invención se refiere a células anfítrionas que contienen los constructos descritos antes. La célula anfítriona puede ser una célula eucariótica superior, tal como una célula de mamífero, o una célula eucariótica inferior, tal como una célula de levadura, o la célula anfítriona puede ser una célula procariótica, tal como una célula bacteriana. La introducción del constructo en la célula anfítriona se puede efectuar mediante transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-Dextrano, o electroporación (Davis, 1986).

30 Se pueden utilizar los constructos en células anfítrionas de una manera convencional para producir el producto génico codificado por la secuencia recombinante. Alternativamente, las enzimas de la invención pueden ser producidas sintéticamente mediante sintetizadores peptídicos convencionales.

35 Las proteínas maduras pueden ser expresadas en células de mamífero, levadura, bacterias, u otras células bajo el control de promotores apropiados. Los sistemas de traducción sin células también se pueden emplear para producir tales proteínas utilizando ARN derivados de los constructos de ADN de la presente invención. La clonación y los vectores de expresión apropiados para su uso con anfítriones procarióticos y eucarióticos se han descrito (p. ej. Sambrook *et al.*, 1989).

40 La transcripción del ADN que codifica la enzimas de la presente invención por eucariotas superiores se incrementa insertando una secuencia intensificadora en el vector. Los intensificadores son elementos de ADN que actúan en cis, usualmente de aproximadamente 10 a 300 pb que actúan sobre un promotor para incrementar su transcripción. Los ejemplos incluyen el intensificador de SV40 del lado tardío del origen de replicación de 100 a 270 pb, un intensificador del promotor temprano de citomegalovirus, el intensificador del polioma del lado tardío del origen de replicación, e intensificadores de adenovirus.

45 Generalmente, los vectores de expresión recombinante incluirán orígenes de replicación y marcadores seleccionables que permitan la transformación de la célula anfítriona, p. ej., el gen de resistencia a ampicilina de *E. coli* y el gen TRP1 de *S. cerevisiae*, y un promotor derivado de un gen altamente expresado para dirigir la transcripción de una secuencia estructural aguas abajo. Tales promotores pueden derivar de operones que codifican enzimas glicolíticas tales como 3-fosfoglicerato quinasa (PGK), factor A, fosfatasa ácida, o proteínas de choque térmico, entre otras. La secuencia estructural heteróloga se ensambla en la fase apropiada con las secuencias de inicio y terminación de la traducción, y preferiblemente, una secuencia líder capaz de dirigir la secreción de la enzima traducida. Opcionalmente, la secuencia heteróloga puede codificar una enzima de fusión incluyendo un péptido de identificación N-terminal que confiere las características deseadas, p. ej., estabilización o purificación simplificada del producto recombinante expresado.

50 Los vectores de expresión útiles para uso bacteriano se construyen insertando una secuencia estructural de ADN que codifica una proteína deseada junto con señales de inicio y terminación de la traducción adecuadas en una fase de lectura operable con un promotor funcional. El vector comprenderá uno o más marcadores seleccionables fenotípicos y un origen de replicación para asegurar el mantenimiento del vector y para proporcionar, si fuera deseable, la amplificación dentro del anfitrión. Los anfítriones procarióticos adecuados para la transformación incluyen *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* y diversas especies de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces*, y *Staphylococcus*, aunque también se pueden emplear otros, es una cuestión de elección.

55 Como ejemplo representativo pero no limitante, los vectores de expresión útiles para uso bacteriano pueden comprender un marcador seleccionable y un origen de replicación bacteriano derivado de plásmidos disponibles en el mercado que comprenden elementos genéticos del vector de clonación pBR322 (ATCC 37017) bien conocido. Tales vectores comerciales incluyen, por ejemplo, pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) y GEM1 (Pro-

ES 2 328 670 T3

mega Biotec, Madison, WI, USA). Estas secciones de la “cadena principal” de pBR322 se combinan con un promotor apropiado y la secuencia estructural que se va a expresar.

Después de la transformación de una cepa anfitriona adecuada y el crecimiento de la célula anfitriona hasta una 5 densidad celular apropiada, el promotor seleccionado es inducido mediante medios apropiados (p. ej., desplazamiento de la temperatura o inducción química) y las células se cultivan durante un período adicional.

Las células se cosechan típicamente mediante centrifugación, se desorganizan mediante medios físicos o químicos, 10 y el extracto bruto resultante se conserva para su purificación adicional.

Las células microbianas empleadas en la expresión de proteínas pueden ser desorganizadas mediante cualquier método conveniente, incluyendo el ciclo de congelación-descongelación, la sonicación, la desorganización mecánica, o el uso de agentes de lisis celular, tales métodos son bien conocidos para los expertos en la técnica.

También se pueden emplear diversos sistemas de cultivo de células de mamífero para expresar la proteína recombinante. Los ejemplos de los sistemas de expresión de mamífero incluyen las líneas COS-7 de fibroblastos de riñón de mono, como se ha descrito (Gluzman, 1981), y otras líneas celulares capaces de expresar un vector compatible, por ejemplo, las líneas celulares C127, 3T3, CHO, HeLa y BHK. Los vectores de expresión en mamífero comprenderán un 15 origen de replicación, un promotor y un intensificador adecuados, y también cualquier sitio de unión al ribosoma, sitio de poliadenilación, sitios donadores y aceptores de empalme, secuencias de terminación transcripcional, y secuencias 20 no transcritas límitrofes 5'. Las secuencias de ADN derivadas de los sitios de empalme, y poliadenilación de SV40 se pueden utilizar para proporcionar los elementos genéticos no transcritos requeridos.

La enzima puede ser recuperada y purificada de los cultivos de células recombinantes mediante métodos que 25 incluyen precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía con fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía con hidroxilapatita y cromatografía con lectina. Se pueden utilizar las etapas de replegamiento de la 30 proteína, según sea necesario, para completar la configuración de la proteína madura. Finalmente, se puede emplear la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) para las etapas de purificación finales.

Las enzimas de la presente invención pueden ser un producto purificado naturalmente, o un producto de procedimientos sintéticos químicos, o producidas mediante técnicas recombinantes a partir de un anfitrión procariótico o 35 eucariótico (por ejemplo, mediante células bacterianas, de levadura, de plantas superiores, de insecto y de mamífero en cultivo). Dependiendo del anfitrión empleado en el procedimiento de producción recombinante, las enzimas de la 40 presente invención pueden estar glicosiladas o pueden no estar glicosiladas. Las enzimas de la invención pueden incluir o no un residuo de aminoácido metionina inicial.

En una realización preferida, la enzima de la presente invención es una enzima fitasa que es estable al calor y resistente al calor y cataliza la hidrólisis enzimática de fitato, *es decir*, la enzima es capaz de renaturalizarse y recuperar 45 la actividad después de un período breve (*es decir*, 5 a 30 segundos), o más largo, por ejemplo, minutos u horas, de exposición a temperaturas de hasta aproximadamente 50°C o ligeramente por encima de 50°C.

La presente invención se describe adicionalmente con referencia a los ejemplos contenidos en la presente memoria; no obstante, se debe entender que la presente invención no está limitada a tales ejemplos. Todas las partes o cantidades, 45 a menos que se especifique de otro modo, son en peso.

La presente invención también proporciona un polinucleótido de fitasa variante aislado, o una de sus porciones oligonucleotídicas que comprende una mutación como se describe en la presente memoria. Según se utiliza en la presente memoria, el término “aislado” o “purificado,” cuando se utiliza en referencia a un polinucleótido, oligonucleótido, o 50 polipéptido, significa que el material está en una forma distinta de aquellas en la que se encuentra normalmente en la naturaleza. De este modo, cuando se produce un polinucleótido o polipéptido en una célula en la naturaleza, un polinucleótido aislado o un polipéptido purificado puede ser uno que está separado, al menos en parte, de los materiales con los que normalmente está asociado. En general, un polinucleótido aislado o un polipéptido purificado está presente en una forma en la que constituye al menos aproximadamente del 5 al 10% de una composición, normalmente del 20% al 55 50% de una composición, particularmente aproximadamente del 50% al 75% de una composición, y preferiblemente aproximadamente del 90% al 95% o más de una composición. Los métodos para aislar un polinucleótido o polipéptido son bien conocidos y rutinarios en la técnica.

Como parte de, o después del aislamiento, un polinucleótido se pueden reunir con otros polinucleótidos, tales como 60 moléculas de ADN, por ejemplo, para estudios de mutagénesis, para formar proteínas de fusión, o para la propagación o expresión del polinucleótido en un anfitrión. Los polinucleótidos aislados, solos o reunidos con otros polinucleótidos, tales como vectores, pueden ser introducidos en células anfitrionas, en cultivo o en organismos completos. Tales polinucleótidos, cuando son introducidos en células anfitrionas en cultivo o en organismos completos, sin embargo se consideran “aislados” debido a que no están en la forma en la que existen en la naturaleza. De un modo similar, los 65 polinucleótidos, oligonucleótidos, y polipéptidos pueden estar presentes en una composición tal como una formulación de medio (soluciones para la introducción de polinucleótidos, oligonucleótidos, o polipéptidos, por ejemplo, en células o composiciones o soluciones para reacciones químicas o enzimáticas que no son composiciones de origen natural) y, allí quedan polinucleótidos, oligonucleótidos, o polipéptidos aislados dentro del significado de ese término según

ES 2 328 670 T3

se emplea en la presente memoria. Un polinucleótido aislado puede ser un polinucleótido que no es inmediatamente contiguo a las secuencias de nucleótidos a las que es inmediatamente contiguo en el genoma u otra molécula de ADN celular de origen natural en la naturaleza. De este modo, un polinucleótido recombinante, puede comprender un polinucleótido incorporado a un vector, un plásmido autónomamente replicante, o un virus; o al ADN genómico de un procariota o un eucariota, que normalmente no expresa un polipéptido concreto.

Según se utiliza en la presente memoria, el término “polinucleótido” u “oligonucleótido” o “secuencia de nucleótidos” o similares hace referencia a un polímero de dos o más nucleótidos o análogos de nucleótidos. El polinucleótido puede ser una molécula de ácido ribonucleico (ARN) o de ácido desoxirribonucleico (ADN), y puede ser ADN o ARN de cadena sencilla o de cadena doble, o un híbrido de ADN:ARN de cadena doble. El polinucleótido u oligonucleótido pueden contener una o más bases modificadas, por ejemplo, inosina o una base trilitada. Los enlaces que conectan los nucleótidos en un polímero son generalmente enlaces fosfodiéster, pero pueden ser otros enlaces utilizados rutinariamente para conectar nucleótidos incluyendo, por ejemplo, enlaces fosforotioato, enlaces tioéster, y similares. Un polinucleótido también puede ser una forma modificada químicamente, enzimáticamente o metabólicamente.

Según se utiliza en la presente memoria, el término “polinucleótido mutante o variante” significa una secuencia de nucleótidos que tiene uno o unos pocos cambios de nucleótidos en comparación con la secuencia de nucleótidos mostrada en los SEQ ID NO: 1, 7 o 9, por ejemplo. El cambio de nucleótido puede ser una delección, inserción o sustitución, y puede ser silencioso de manera que no haya cambio en el marco de lectura de un polipéptido codificado por el polinucleótido de tipo salvaje, o puede ser un cambio que de como resultado un cambio de aminoácido o la introducción de un codón de PARADA en el polinucleótido, o un cambio en una secuencia de nucleótidos implicada en la transcripción o traducción del polinucleótido, por ejemplo, un cambio que de como resultado una alteración del empalme de un transcripto del gen en un ARNm.

Por conveniencia para su estudio y para su uso como marco de referencia, la secuencia de nucleótidos de la fitasa expuesta en el SEQ ID NO: 1 o el SEQ ID NO: 7 es referida como poli nucleótido de tipo salvaje o secuencia génica de “tipo salvaje”, y, de un modo similar, el polipéptido mostrado como SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 8 es referido como polipéptido de fitasa de tipo salvaje.

Los ejemplos de una secuencia de polinucleótidos de fitasa variante incluyen secuencias sustancialmente como las mostradas en el SEQ ID NO: 7, donde el polinucleótido tiene una secuencia de nucleótidos como se expone en a) el SEQ ID NO: 9; b) el SEQ ID NO: 9 donde todas las T son U (ARN); donde la expresión del ácido nucleico que codifica la fitasa conduce a la producción de dicha enzima fitasa sustancialmente pura; y c) el SEQ ID NO: 7, donde 390 es G; 391 es A; el nucleótido 438 es T; 439 es G; 440 es G; 471 es C; 473 es T; 477 es T; 448 es G; 449 es T; 690 es G; 691 es A; 692 es G; 729 es T; 730 es A; 731 es T; 864 es T; 865 es G; 1017 es G, o una cualquiera de sus combinaciones. Una secuencia de nucleótidos variante es sustancialmente idéntica al SEQ ID NO: 7, y tiene una secuencia de nucleótidos modificada seleccionada entre el nucleótido 390 es G y 391 es A; el nucleótido 438 es T, 439 es G y 440 es G; 471 es C y 473 es T; 477 es T, 448 es G, y 449 es T; 690 es G, 691 es A y 692 es G; 729 es T, 730 es A, y 731 es T; 864 es T y 865 es G; 1017 es G, o una cualquiera de sus combinaciones.

Los polinucleótidos mutantes incluyen secuencias de polinucleótidos que hibridan selectivamente con los complementos de las secuencias de polinucleótidos, o sus porciones oligonucleotídicas, descritos en la presente memoria, en condiciones de hibridación muy restrictivas, por ej., hibridación a ADN unido a un filtro en NaHPO₄ 0,5 M, dodecilsulfato de sodio al 7% (SDS), EDTA 1 mM a 65°C, y lavado en 0,1 x SSC/SDS al 0,1% a 68°C (Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, (Green Publishing Associates, Inc., y John Wiley & Sons, Inc., Nueva York 1989), y suplementos; véase p. 2.10.3; Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)). Los mutantes también incluyen polinucleótidos que codifican un polipéptido de fitasa sustancialmente como se muestra en el SEQ ID NO: 8, pero que tiene una o más mutaciones; o un ARN correspondiente a semejante polinucleótido (p. ej., SEQ ID NO: 9).

Una secuencia polinucleotídica o polipeptídica que es “sustancialmente idéntica” a un polinucleótido de fitasa del SEQ ID NO: 1 o el SEQ ID NO: 7 o una secuencia polipeptídica del SEQ ID NO: 2 o el SEQ ID NO: 8 es idéntica generalmente en al menos 80% o 85%, usualmente al menos aproximadamente 90%, y particularmente al menos aproximadamente 95%, y preferiblemente al menos aproximadamente 99% a la secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos mostrada en los SEQ ID NO: 1, 7 o 9 o los SEQ ID NO: 2, 8 o 10, respectivamente. Una secuencia polinucleotídica o polipeptídica que es sustancialmente idéntica a los SEQ ID NO: 1, 7, 9 o 2, 8, o 10 variará en uno o más de los sitios que tienen una mutación, por ejemplo, una mutación presente en un polinucleótido de fitasa variante como se muestra en el párrafo anterior. La identidad de secuencia se puede medir utilizando el soporte lógico de análisis de secuencias (por ej., Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, Universidad de Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison WI53705).

Un polinucleótido o una porción oligonucleotídica del mismo según se describe en la presente memoria puede ser útil, por ejemplo, como sonda o como cebador para una reacción de amplificación. La referencia a una “porción oligonucleotídica” de un polinucleótido significa que una secuencia de nucleótidos del polinucleótido variante o mutante es menor que el polinucleótido completo. Generalmente, un oligonucleótido útil como sonda o un cebador contiene al menos aproximadamente 10 nucleótidos, y usualmente contiene aproximadamente de 15 a 30 nucleótidos o más (véanse, por ejemplo, las Tablas 1 y 2). Los polinucleótidos y oligonucleótidos se pueden preparar mediante cualquier método adecuado, incluyendo, por ejemplo, mediante de digestión con enzimas de restricción de un polinucleótido

ES 2 328 670 T3

apropiado, mediante síntesis química directa utilizando un método tal como el método del fosfotriéster (Narang *et al.*, 1979, Meth. Enzymol., 68:90-99); el método del fosfodiéster (Brown *et al.*, 1979, Meth. Enzymol., 68:109-151) - el método de la dietilfosforamidita (Beaucage *et al.*, 1981, Tetrahedron Lett., 22:1859-1862); el método del triester (Matteucci *et al.*, 1981, J. Am. Chem. Soc., 103: 3185-3191), incluyendo los métodos de síntesis automatizados; o mediante el método del soporte sólido (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.458.066). Además, se puede preparar un polinucleótido u oligonucleótido utilizando métodos de ADN recombinante como los descritos en la presente memoria o conocidos de otro modo en la técnica.

Un oligonucleótido puede incluir una porción de un polinucleótido de fitasa, incluyendo, por ejemplo, una secuencia sustancialmente idéntica a la del SEQ ID NO: 7, excepto donde el nucleótido 390 es G; 391 es A; el nucleótido 438 es T; 439 es G; 440 es G; 471 es C; 473 es T; 477 es T; 448 es G; 449 es T; 690 es G; 691 es A; 692 es G; 729 es T; 730 es A; 731 es T; 864 es T; 865 es G; 1017 es G, o donde el oligonucleótido contiene una combinación de tales sustituciones con respecto al SEQ ID NO:7. De este modo, como se describe en la presente memoria, el oligonucleótido puede tener cualquier longitud y puede abarcar una o más de las mutaciones anteriores.

Un oligonucleótido puede hibridar selectivamente con una secuencia de nucleótidos de fitasa mutante como se describe en la presente memoria. Según se utiliza en la presente memoria, "hibridar selectivamente" hace referencia a la capacidad de una sonda oligonucleotídica (o polinucleotídica) para hibridar con un polinucleótido mutante, pero no sustancialmente con una secuencia de tipo salvaje. Las condiciones de hibridación que permiten la hibridación selectiva se pueden obtener variando la restricción de las condiciones de hibridación, como se ha descrito antes, y dependerán en parte, de la longitud de la sonda, del contenido de G:C relativo, de la concentración de sal, y similares (véase Sambrook *et al.*, *supra*, 1989). Las condiciones de hibridación que son condiciones muy restrictivas incluyen, por ejemplo, lavado en 6 x SSC/pirofosfato de sodio al 0,05% a aproximadamente 37°C (para una sonda de ADN de 14 nucleótidos), aproximadamente 48°C (para una sonda de 17 nucleótidos), aproximadamente 55°C (para una sonda de 20 nucleótidos), y aproximadamente 60°C (para una sonda de 23 nucleótidos).

Se puede utilizar un oligonucleótido como sonda para escrutar en busca de una variante o mutante de interés. Además, los oligonucleótidos incluyen una molécula antisentido, que puede ser útil, por ejemplo, en reacciones de regulación y amplificación polinucleotídicas de secuencias de polinucleótidos, incluyendo secuencias de polinucleótidos de fitasa. Adicionalmente, tales oligonucleótidos se pueden utilizar como parte de una ribozima o una secuencia de triple hélice para la regulación del gen de la fitasa. Aún más, tales oligonucleótidos se pueden utilizar como componente de un método de diagnóstico, por medio del cual se puede determinar el nivel de transcripto de fitasa. Adicionalmente, tales oligonucleótidos se pueden utilizar, por ejemplo, para escrutar e identificar homólogos de fitasa de otras especies.

El término "cebador" o "cebador de PCR" hace referencia a un oligonucleótido natural o sintético que puede actuar como punto de inicio de la síntesis de ADN cuando se sitúa en condiciones adecuadas para la prolongación del cebador. La síntesis de un producto de prolongación del cebador se inicia en presencia de nucleósido trifosfatos y una polimerasa en un tampón apropiado a una temperatura adecuada. Un cebador puede comprender una pluralidad de cebadores, por ejemplo, cuando existe cierta ambigüedad en la información referente a uno o ambos extremos de la región diana que se va a sintetizar. Por ejemplo, si se determina una secuencia de ácido nucleico a partir de una secuencia de proteína, un cebador generado para sintetizar la secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de proteína puede comprender una colección de cebadores que contienen secuencias que representan todas las posibles variaciones de codones basadas en la degeneración del código genético. Uno o más de los cebadores de esta colección será homólogo al extremo de la secuencia diana o una secuencia que limite con la secuencia diana. Del mismo modo, si una región conservada muestra niveles significativos de polimorfismo en una población, se pueden preparar mezclas de cebadores que amplificarán secuencias adyacentes.

Durante la amplificación por PCR, se utilizan pares de cebadores que flanquean una secuencia diana de interés para amplificar la secuencia diana. Un par de cebadores comprende típicamente un cebador directo, que hibrida con el extremo 5' de la secuencia diana, y un cebador inverso, que hibrida con el extremo 3' de la secuencia diana. Un par de cebadores incluye al menos un cebador directo y al menos un cebador inverso que permite la generación de un producto de amplificación, que puede ser un producto de amplificación específico de grandes fragmentos de fitasa o un producto de amplificación anidada de semejante producto de amplificación, incluyendo un cebador directo e inverso siempre que el cebador directo se encuentre en 5' (aguas arriba) con respecto al cebador inverso con referencia a una secuencia diana de polinucleótidos, y que los cebadores estén suficientemente próximos de manera que se pueda generar un producto de amplificación.

Las secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína de fusión se pueden producir y se pueden conectar operativamente a secuencias para el control de la expresión. Tales proteínas de fusión y composiciones son útiles en el desarrollo de anticuerpos o para generar y purificar péptidos y polipéptidos de interés. Según se utiliza en la presente memoria, el término "conectado operativamente" hace referencia a una yuxtaposición, donde los componentes así descritos están en una relación que permite que funcionen de la manera pretendida. Por ejemplo, una secuencia de control de la expresión conectada operativamente a una secuencia codificante se liga de manera que se logre la expresión de la secuencia codificante en condiciones compatibles con las secuencias de control de la expresión, mientras dos secuencias codificantes conectadas operativamente se pueden ligar de manera que estén en el mismo marco de lectura y, por lo tanto, codifiquen una proteína de fusión.

ES 2 328 670 T3

Según se utiliza en la presente memoria, el término “secuencias de control de la expresión” hace referencia a secuencias de ácido nucleico que regulan la expresión de una secuencia de ácido nucleico a la cual están conectadas operativamente. Las secuencias de control de la expresión están conectadas operativamente a una secuencia de ácido nucleico cuando las secuencias de control de la expresión controlan y regulan la transcripción y, cuando sea apropiado,

- 5 la traducción de la secuencia de ácido nucleico. De este modo, las secuencias de control de la expresión pueden incluir promotores, intensificadores, terminadores de la transcripción, un codón de inicio (es decir, ATG) delante de un gen que codifica la proteína, señales de empalme para intrones, mantenimiento del marco de lectura correcto de ese gen para permitir la traducción apropiada del ARNm, y codones de TERMINACIÓN. Las secuencias de control incluyen, como mínimo, componentes cuya presencia puede influir en la expresión, y también pueden incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias compañeras de fusión. Las secuencias de control de la expresión pueden incluir un promotor.
- 10

Un polinucleótido puede comprender una porción de una molécula de ácido nucleico recombinante, que, por ejemplo, puede codificar una proteína de fusión. El polinucleótido, o la molécula de ácido nucleico recombinante, 15 pueden ser insertados en un vector, que puede ser un vector de expresión, y pueden derivar de un plásmido, un virus o similares. El vector de expresión generalmente contiene un origen de replicación, un promotor, y uno o más genes que permiten la selección fenotípica de células transformadas que contienen el vector. Los vectores adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero no están limitados al vector de expresión basado en T7 para la expresión 20 en bacterias (Rosenberg, *et al.*, Gene 56: 125, 1987), el vector de expresión pMSXND para la expresión en células de mamífero (Lee y Nathans, J. Biol. Chem. 263: 3521, 1988); vectores de expresión derivados de baculovirus para la expresión en células de insecto; y similares.

La elección de un vector también dependerá del tamaño de la secuencia de polinucleótidos y la célula anfitriona que se vaya a emplear en los métodos de la invención. De este modo, el vector utilizado en la invención puede ser un 25 plásmido, fago, cósmido, fagémido, virus (p. ej., retrovirus, parainfluenzavirus, herpesvirus, reovirus, paramyxovirus, y similares), o porciones seleccionadas de los mismos (p. ej., proteína de la envoltura, glicoproteína de las espículas, proteína de la cápside). Por ejemplo, los cósmidos y los fagémidos se utilizan típicamente cuando la secuencia de ácido nucleico específica que se va a analizar o modificar es grande debido a que estos vectores son capaces de propagar establemente polinucleótidos grandes. Los cósmidos y los fagémidos son particularmente adecuados para la expresión 30 o manipulación de los polinucleótidos de fitasa del SEQ ID NO: 1 o 7 o un polinucleótido de fitasa mutante como en el SEQ ID NO: 9.

En levaduras, se pueden utilizar numerosos vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles (véanse Ausubel *et al.*, *supra*, 1989; Grant *et al.*, Meth. Enzymol. 153: 516-544, 1987; Glover, ADN Cloning, Vol. II, IRL 35 Press, Washington D. C., Ch. 3, 1986; y Bitter, Meth. Enzymol. 152: 673-684, 1987; y The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces, Eds. Strathem *et al.*, Cold Spring Harbor Press, Vols. I y II, 1982). Se puede utilizar un promotor de lavadura constitutivo tal como ADH o LEU2 o un promotor inducible tal como GAL (“Cloning in Yeast,” Cap. 3, Rothstein, En “DNA Cloning” Vol. 11, A Practical Approach, ed. Glover, IRL Press, 1986). Alternativamente, se 40 pueden utilizar vectores que promueven la integración de secuencias de ADN foráneas en el cromosoma de levadura. La construcción de vectores de expresión y la expresión de genes en células transfectadas implican el uso de mecanismos de clonación molecular también bien conocidas en la técnica (véase Sambrook *et al.*, *supra*, 1989; Ausubel *et al.*, *supra*, 1989). Estos métodos incluyen mecanismos de ADN recombinante *in vitro*, mecanismos sintéticos y recombinación *in vivo*/recombinación genética.

45 Un polinucleótido u oligonucleótido puede estar contenido en un vector y puede ser introducido en una célula mediante transformación o transfección de la célula. Por “transformación” o “transfección” se quiere significar un cambio genético permanente (estable) o transitorio inducido en una célula después de la incorporación de ADN nuevo (es decir, ADN exógeno a la célula). Cuando la célula es una célula de mamífero, el cambio genético permanente se logra generalmente mediante la introducción del ADN en el genoma de la célula.

50 Una célula transformada o una célula anfitriona puede ser cualquier célula procariótica o eucariótica en la que (o en un antecesor de la cual) se ha introducido, por medio de técnicas de ADN recombinante, una secuencia de polinucleótidos de la invención o uno de sus fragmentos. La transformación de una célula anfitriona se puede llevar a cabo mediante mecanismos convencionales como los que son bien conocidos para los expertos en la técnica. Cuando el anfitrión es un procariota, tal como *E. coli*, se pueden preparar células competentes que son capaces de absorber ADN 55 a partir de células cosechadas tras la fase de crecimiento exponencial y se pueden tratar con posterioridad mediante el método del CaCl₂ por medio de procedimientos bien conocidos en la técnica, o utilizando MgCl₂ o RbCl. También se puede realizar la transformación después de formar un protoplasto de la célula anfitriona o mediante electroporación.

60 Cuando el anfitrión es un eucariota, tales métodos de transfección incluyen el uso de coprecipitados de fosfato de calcio, procedimientos mecánicos convencionales tales como microinyección, electroporación, inserción de un plásmido encerrado en liposomas, o el uso de vectores de virus, u otros métodos conocidos en la técnica. En un método se utiliza un vector viral eucariótico, tal como el virus de simios 40 (SV40) o el papilomavirus bovino, para infectar transitoriamente o transformar células eucarióticas y expresar la proteína. (Eucariotic Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratory, Gluzman ed., 1982). Preferiblemente, se utiliza un anfitrión eucariótico como célula anfitriona como 65 se describe en la presente memoria. La célula eucariótica puede ser una célula de levadura (p. ej., *Saccharomyces cerevisiae*), o puede ser una célula de mamífero, incluyendo una célula humana.

Se pueden utilizar una variedad de sistemas de expresión de anfitrón-vector para expresar una secuencia de nucleótidos de fitasa tal como el SEQ ID NO: 1 o el SEQ ID NO: 7, una secuencia codificante del SEQ ID NO: 1 o un polinucleótido de fitasa mutante tal como el SEQ ID NO: 9. Tales sistemas de expresión con anfitrón representan vehículos por medio de los cuales se pueden producir las secuencias de nucleótidos de interés y se puede purificar

- 5 con posterioridad, y también representan células que, cuando son transformadas o transfectadas con las secuencias de nucleótidos codificantes apropiadas, pueden expresar una proteína, incluyendo un polipéptido variante o mutante o una de sus porciones peptídicas *in situ*. Tales células incluyen, pero no están limitadas a, microorganismos tales como bacterias (p. ej., *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófago recombinante, ADN plasmídico o ADN cosmídico que contienen un polinucleótido, o una de sus porciones oligonucleotídicas (tipo salvaje, variante u otro mutante); levadura (p. ej., *Saccharomyces*, *Pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen un polinucleótido, o una de sus porciones oligonucleotídicas (tipo salvaje, variante u otro mutante); sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (p. ej., baculovirus) que contienen un polinucleótido, o una de sus porciones oligonucleotídicas (tipo salvaje, variante u otro mutante); sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión de virus recombinante (p. ej., virus 10 del mosaico de la coliflor o virus del mosaico del tabaco) o transformadas con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (p. ej., plásmido Ti) que contiene un polinucleótido mutante o una de sus porciones oligonucleotídicas; o sistemas de células de mamífero (p. ej., COS, CHO, BHK, 293, 3T3) que albergan constructos de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (p. ej., promotor de la metalotioneína) 15 o de virus de mamíferos (p. ej., el promotor tardío de adenovirus; el promotor de 7,5 K del virus vaccinia).

20 En sistemas bacterianos, se pueden seleccionar ventajosamente numerosos vectores de expresión dependiendo del uso pretendido de la proteína fitasa (tipo salvaje, variante u otro mutante de fitasa) que está siendo expresada. Por ejemplo, cuando se va a producir una gran cantidad de semejante proteína, para la generación de anticuerpos, o para escrutar genotecas peptídicas, pueden ser deseables vectores que dirigen la expresión de elevados niveles de proteínas 25 de fusión producto que son fácilmente purificadas. Tales vectores incluyen, pero no están limitados a, el vector de expresión en *E. coli* pPUR278 (Ruter *et al.*, 1983, EMBO J. 2:1791), en el que un polinucleótido de fitasa, o una de sus porciones oligonucleotídicas (tipo salvaje, variante u otro mutante) pueden ser ligados individualmente en el vector en marco con la región codificante de lac Z de manera que se produce una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye y Inouye, Nucl. Acids Res. 13:3101-3109, 1985; Van Heeke y Schuster, J. Biol. Chem. 264:5503-5509, 1989); y similares. También se pueden utilizar vectores pGEX para expresar polipéptidos foráneos en forma de proteínas de fusión con glutation-S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y pueden ser fácilmente purificadas a partir de células lisadas mediante adsorción sobre cuentas de glutation-agarosa seguido de elución en presencia de glutation libre. Los vectores pGEX se diseñan para que incluyan sitios de escisión de trombina o proteasa factor Xa de manera que la proteína fitasa clonada, la variante o el mutante puedan ser liberados del radical 30 GST.

35 En un sistema de insecto, se utiliza virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) como vector para expresar genes foráneos. El virus crece sobre células de *Spodoptera frugiperda*. Un polinucleótido de fitasa, o una de sus porciones oligonucleotídicas se puede clonar individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo el 40 gen de la polihedrina) del virus y colocar bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo el promotor de la polihedrina). La inserción satisfactoria de un polinucleótido de fitasa, o una de sus porciones oligonucleotídicas dará como resultado la inactivación del gen de la polihedrina y la producción de virus recombinante no ocluido (*es decir*, virus que carece de la cubierta proteinácea codificada por el gen de la polihedrina). Estos virus recombinantes se utilizan después para infectar células de *Spodoptera frugiperda* en las que se expresa el gen insertado (véase Smith *et al.*, 1983, J. Virol. 46:584; Patente de los Estados Unidos Núm. 4.215.051).

En células anfitrionas de mamífero, se pueden utilizar numerosos sistemas de expresión basados en virus. En los casos en los que se utiliza un adenovirus como vector de expresión, se puede ligar un polinucleótido de fitasa, o una 45 de sus porciones oligonucleotídicas, a un complejo de control de la transcripción/traducción de adenovirus, p. ej., el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Este gen químérico puede ser insertado después en el genoma de adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral tal como la región E1 o E3 da como resultado un virus recombinante que es viable y capaz de expresar una proteína fitasa (p. ej., tipo salvaje, o sus variantes o mutantes) en los anfitriones infectados (Logan y Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 81:3655-3659, 1984). También se pueden requerir señales de inicio específicas para una traducción eficaz de la 50 secuencia de fitasa insertada. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. Cuando se inserta un polinucleótido completo, incluyendo su propio codón de iniciación y secuencias adyacentes, en el vector de expresión apropiado, pueden no ser necesarias señales de control traduccional adicionales. Sin embargo, cuando solo se inserta una porción de una secuencia, se deben proporcionar señales de control traduccional exógenas, incluyendo, 55 por ejemplo, un codón de iniciación ATG. Además, el codón de iniciación debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para asegurar la traducción del inserto completo. Estas señales de control de la traducción exógenas y codones de iniciación pueden ser de diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. Se puede aumentar la eficacia de expresión mediante la inclusión de elementos intensificadores de la transcripción apropiados, terminadores de la transcripción, y similares (véase Bittner *et al.*, Meth. Enzymol. 153:516-544, 1987).

60 Además, se puede seleccionar una cepa de células anfitrionas que modula la expresión de las secuencias insertadas, o modifica y procesa el polipéptido expresado de una manera específica. Tales modificaciones (p. ej., glicosilación) y procesamientos (p. ej., escisión) de los productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Las diferentes células anfitrionas tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y la modificación

post-traduccionales de las proteínas. Se pueden seleccionar líneas celulares o sistemas anfitriones apropiados para asegurar la correcta modificación y procesamiento de la proteína foránea que está siendo expresada. Con este fin, se pueden utilizar las células anfitrionas eucarióticas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento apropiado del transcripto primario, la glicosilación, y la fosforilación del polipéptido. Tales células anfitrionas de mamífero incluyen, pero no están limitadas a, CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, WI38, y similares.

Para la producción de elevado rendimiento, a largo plazo de proteínas recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, se pueden diseñar líneas celulares que expresan establemente una proteína, incluyendo el tipo salvaje, las variantes o los mutantes de fitasa. En lugar de utilizar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación virales, las células anfitrionas se pueden transformar con ADN controlado por elementos de control de la expresión apropiados (p. ej., secuencias promotoras y/o intensificadoras, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, y similares), y un marcador seleccionable. Después de la introducción del ADN foráneo, las células diseñadas se pueden hacer crecer durante 1-2 días en medio enriquecido, cambiándose después a medio selectivo. El marcador seleccionable del plásmido recombinante confiere resistencia para la selección y permite que las células integren establemente el plásmido en sus cromosomas y crezcan hasta formar focos, que pueden ser clonados después y ampliados en líneas celulares. Este método puede ser utilizado ventajosamente para diseñar líneas celulares que expresan una variante o polipéptido mutante de fitasa. Tales líneas celulares diseñadas pueden ser particularmente útiles en el escrutinio y la evaluación de compuestos que afectan a la actividad endógena de un polipéptido variante o mutante de fitasa. Tales líneas celulares diseñadas también pueden ser útiles para discriminar entre factores que tienen efectos específicos vs. no específicos. En particular, las líneas celulares mutantes deben carecer de funciones clave, y se pueden utilizar diversas mutaciones para identificar los dominios funcionales clave empleando análisis *in vivo*.

Se pueden utilizar numerosos sistemas de selección, incluyendo pero no limitados al gen de la timidina quinasa del virus del herpes simplex (Wigler *et al.*, Cell 11:223,1977), de la hipoxantina-guanina fosforribosil-transferasa (Szybalska y Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:2026, 1962), y de la adenina fosforribosiltransferasa (Lowy *et al.*, Cell 22:817, 1980) en células tk⁻, hprt⁻ o aprt⁻, respectivamente. También se pueden utilizar los genes de resistencia a antimetabolitos como base de la selección para dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:3567,1980; O'Hare *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527, 1981); gpt, que confiere resistencia a ácido micofénólico (Mulligan y Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072,1981); neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 (Colberre-Garapin *et al.*, J. Mol. Biol. 150:1,1981); e hygro, que confiere resistencia a higromicina (Santerre *et al.*, Gene 30:147,1984). Por lo tanto, la invención proporciona un vector que contiene un polinucleótido de fitasa mutante, o una de sus porciones oligonucleotídicas, incluyendo un vector de expresión que contiene cualquiera de las secuencias anteriores asociada operativamente con un elemento regulador que dirige la expresión de una secuencia codificante o un cebador; y también proporciona una célula anfitriona que contiene cualquiera de las secuencias anteriores, sola o asociada operativamente con un elemento regulador, que puede dirigir la expresión de un polipéptido codificado por el polinucleótido, según sea apropiado.

Se puede aislar una secuencia de polinucleótidos de fitasa mutante realizando una reacción en cadena de la polimerasa (PCR; véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.683.202) utilizando dos cebadores oligonucleotídicos, incluyendo reservas de cebadores degenerados diseñados sobre la base de las secuencias de aminoácidos de un polipéptido de fitasa tal como la descrita en el SEQ ID NO: 8 o uno de sus mutantes como se describe en la presente memoria. El molde para la reacción puede ser un ADNc obtenido mediante transcripción inversa del ARNm preparado a partir de organismos que se sabe que expresan una enzima fitasa o un homólogo. El producto de la PCR puede ser subclonado y secuenciado o manipulado de muchas maneras (p. ej., manipulado adicionalmente mediante PCR anidada) para asegurarse de que las secuencias amplificadas representan las secuencias de una secuencia polinucleotídica de fitasa o mutante. El fragmento de la PCR puede ser utilizado después para aislar un clón de ADNc completo (incluyendo clones que contienen una secuencia de polinucleótidos mutante) mediante marcaje del fragmento amplificado y escrutinio de una genoteca de ácido nucleico (p. ej., una genoteca de ADNc de bacteriófago). Alternativamente, se puede utilizar el fragmento marcado para escrutar una genoteca genómica (para una revisión de las estrategias de clonación, véanse, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *supra*, 1989; Ausubel *et al.*, *supra*, 1989).

Los polipéptidos de fitasa que han sido modificados a partir de la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje incluyen sustituciones de residuos de aminoácido, por ejemplo, aminoácidos cargados negativamente que incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; aminoácidos cargados positivamente que incluyen lisina y arginina; aminoácidos con grupos de cabeza polar no cargados que tienen valores del carácter hidrófilo similares que incluyen los siguientes: leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina y tirosina. En muchos casos, no obstante, una sustitución de un nucleótido puede ser silenciosa, no dando como resultado ningún cambio en el polipéptido codificado.

Los polipéptidos o péptidos sintéticos pueden ser preparados mediante síntesis química, por ejemplo, métodos de síntesis peptídica química en fase sólida, que son bien conocidos (véanse, por ejemplo, Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2154, 1963; Stewart y Young, Solid Phase Peptide Synthesis, Segunda ed., Pierce Chemical Co., Rockford, III., pág. 1112), y han sido empleados en kits de diseño y síntesis de péptidos en el laboratorio disponibles en el mercado (Cambridge Research Biochemicals). Tales kits de laboratorio disponibles en el mercado han utilizado generalmente las enseñanzas de Geysen *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81: 3998(1984) y proporcionan péptidos sintetizadores sobre las puntas de multitud de varillas o alfileres, cada uno de los cuales está conectado a una única placa. Cuando se utiliza semejante sistema, se invierte una placa de varillas o alfileres y se inserta en una segunda placa con los correspondientes pocillos o reservorios, que contienen soluciones para adjuntar o anclar un aminoácido apro-

ES 2 328 670 T3

piado a las puntas de los alfileres o las varillas. Repitiendo etapa del procedimiento, es decir, invirtiendo e insertando las puntas de las varillas o alfileres en soluciones apropiadas, los aminoácidos construyen los péptidos deseados.

Se encuentran disponibles numerosos sistemas de síntesis peptídica FMOC asequibles. Por ejemplo, se puede lle-

- 5 var a cabo el ensamblaje de un polipéptido o fragmento sobre un soporte sólido utilizando un sintetizador peptídico automatizado Modelo 431 A de Applied Biosystems, Inc. Semejante equipo proporciona un rápido acceso a los péptidos de la invención, ya sea mediante síntesis directa o mediante síntesis de una serie de fragmentos que se pueden acoplar utilizando otras técnicas conocidas. Por lo tanto, los métodos para la síntesis química de polipéptidos y péptidos son bien conocidos para los expertos en la técnica, p. ej., se pueden sintetizar péptidos mediante mecanismos en 10 fase sólida, escindirlos de la resina y purificarlos mediante cromatografía líquida de alta resolución preparativa (véase, p. ej., Creighton, 1983, *Proteins: Structures and Molecular Principles*, W. H. Freeman & Co., N. Y., págs. 50-60).

- 15 La composición de los péptidos sintéticos se puede confirmar mediante análisis de aminoácidos o secuenciación; por ej., utilizando los procedimientos de degradación de Edman (véase por ej., Creighton, 1983, *supra* en las págs. 34-49). De este modo se pueden sintetizar químicamente fragmentos del polipéptido de fitasa, variante, o mutante.

Los métodos para producir una enzima fitasa se muestran en la Figura 1. El método incluye hacer crecer una célula anfitriona que contiene un polinucleótido que codifica la enzima (p. ej., SEQ ID NO: 1, 7 o 9), en condiciones que permiten la expresión del ácido nucleico, y opcionalmente aislar la enzima codificada por el ácido nucleico. Los 20 métodos de cultivo de la célula anfitriona se describen en los Ejemplos y son conocidos por los expertos en la técnica.

En una particular realización, la presente invención proporciona para la expresión de un polipéptido con actividad fitasa en plantas transgénicas u órganos de plantas y métodos para su producción. Se proporcionan constructos de 25 expresión ADN para la transformación de plantas con un gen que codifica fitasa bajo el control de secuencias reguladoras que son capaces de dirigir la expresión de la fitasa. Estas secuencias reguladoras incluyen secuencias capaces de dirigir la transcripción en plantas, ya sea constitutivamente, o en maneras específicas de la fase y/o tejido.

El modo de expresión depende, en parte, del uso de la planta o sus partes. Las plantas transgénicas y los órganos de plantas proporcionados por la presente invención se pueden aplicar a diversos procedimientos industriales ya sea 30 directamente, p. ej. en alimentos animales o alternativamente, se puede extraer la fitasa expresada y si se desea, purificarla antes de la aplicación. Alternativamente, la planta anfitriona recombinante o parte de la planta se pueden utilizar directamente. En un aspecto particular, la presente invención proporciona métodos de catálisis de reacciones de hidrólisis de fitato utilizando semillas que contienen cantidades elevadas de fitasa. El método implica poner en contacto 35 semillas de tipo no salvaje, transgénicas, preferiblemente en forma triturada o mascada, con sustrato que contiene fitato y permitir que las enzimas de las semillas aumenten la velocidad de reacción. Al añadir directamente las semillas a un sustrato que contiene fitato, la invención proporciona una solución al procedimiento costoso y problemático de extraer y purificar la enzima. En una exemplificación particular - pero en ningún caso limitante, la presente invención también proporciona métodos de tratamiento por medio de los cuales a un organismo que carece de suficiente carga 40 de una enzima se le administra la enzima en forma de semillas que contienen cantidades elevadas de la enzima. En una realización preferida, el ritmo de la administración de la enzima a un organismo se coordina con el consumo de productos alimenticios que contienen fitato.

La expresión de fitasa en plantas se puede lograr mediante una variedad de métodos. Específicamente, por ejemplo, se encuentran disponibles tecnologías para transformar un gran número de especies de plantas, incluyendo especies dicotiledóneas (p. ej. tabaco, patata, tomate, Petunia, Brassica). Adicionalmente, por ejemplo, se encuentran disponibles estrategias para la expresión de genes foráneos en plantas. Adicionalmente, se han identificado secuencias reguladoras de genes vegetales que son útiles para la construcción de genes quiméricos que pueden ser funcionalmente expresados 45 en plantas y en células vegetales (p. ej. Klee *et al.*, 1987; Clark *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1990).

50 La introducción de constructos génicos en plantas se puede lograr utilizando diversas tecnologías incluyendo la transformación con *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes*. Los ejemplos no limitantes de los tejidos vegetales que se pueden transformar de este modo incluyen protoplastos, microesporas o polen, y explantes tales como hojas, tallos, raíces, hipocotilos, y cotilos. Además, se puede introducir el ADN directamente en los protoplastos y 55 células o tejidos vegetales mediante microinyección, electroporación, bombardeo con partículas, y absorción directa de ADN.

Se pueden producir proteínas en plantas mediante una variedad de sistemas de expresión. Por ejemplo, el uso de un promotor constitutivo tal como el promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (Guilley *et al.*, 1982) es útil para la acumulación de la proteína expresada en virtualmente todos los órganos de la planta transgénica. Alternativamente, 60 el uso de promotores que son altamente específicos del tejido y/o específicos de la fase resulta útil para esta invención (Higgins, 1984; Shotwell, 1989) con el fin de desviar la expresión a los tejidos deseados y/o a la fase de desarrollo deseada. Los detalles adicionales relevantes para la expresión en plantas de las moléculas de fitasa de la presente invención se describen, por ejemplo, en el documento USPN 5.770.413 (Van Ooijen *et al.*) y el documento USPN 5.593.963 (Van Ooijen *et al.*), aunque estas referencias no ilustran las moléculas inventivas de la presente solicitud y 65 en lugar de ello ilustran el uso de fitasas fúngicas.

En síntesis, resulta relevante para esta invención que se puedan utilizar una variedad de medios para lograr la expresión recombinante de fitasa en una planta transgénica o porción de planta. Tales plantas transgénicas y porciones

ES 2 328 670 T3

de plantas son útiles como fuentes de fitasa expresada recombinantemente, que se puede añadir directamente a fuentes que contienen fitato. Alternativamente, la fitasa expresada por la planta recombinante puede ser extraída de la fuente vegetal y, si se desea, purificada antes de ponerla en contacto con el sustrato de la fitasa.

- 5 En el contexto de la presente invención, las plantas que se van a seleccionar incluyen, pero no están limitadas a cultivos que producen flores comestibles tales como la coliflor (*Brassica oleracea*), la alcachofa (*Cynara scolymus*), frutas tales como la manzana (*Malus*, p. ej. *domesticus*), la banana (*Musa*, p. ej. *acuminata*), las bayas (tales como pasas, *Ribes*, p. ej. *rubrum*), cerezas (tales como cerezas, *Prunus*, p. ej. *avium*), pepino (*Cucumis*, p. ej. *sativus*), uvas (*Vitis*, p. ej. *vinifera*), limón (*Citrus limon*), melón (*Cucumis melo*), nueces (tales como nuez de nogal, *Juglans*, p. ej. *regia*; cacahueta, *Arachis hipogaea*), naranja (*Citrus*, p. ej. *maxima*), melocotón (*Prunus*, p. ej. *persica*), pera (*Pyra*, p. ej. *communis*), ciruela (*Prunus*, p. ej. *domestica*), fresa (*Fragaria*, p. ej. *moschata*), tomate (*Lycopersicon*, p. ej. *esculentum*), hojas, tales como alfalfa (*Medicago*, p. ej. *sativa*), coles (p. ej. *Brassica oleracea*), endivias (*Cichoreum*, p. ej. *endivia*), puerro (*Allium*, p. ej. *porrum*), lechuga (*Lactuca*, p. ej. *sativa*), espinacas (*Spinacia*, p. ej. *oleraceae*), tabaco (*Nicotiana*, p. ej. *tabacum*), raíces, tales como arrurruz (*Maranta*, p. ej. *arundinacea*), remolacha (*Beta*, p. ej. *vulgaris*), zanahoria (*Daucus*, p. ej. *carota*), Yuca (*Manihot*, p. ej. *esculenta*), nabo (*Brassica*, p. ej. *rapa*), rábano (*Raphanus*, p. ej. *sativus*), ñame (*Dioscorea*, p. ej. *esculenta*), batata (*Ipomoea batatas*) y semillas, tales como judía (*Phaseolus*, p. ej. *vulgaris*), guisante (*Pisum*, p. ej. *sativum*), soja (*Glycine*, p. ej. *max*), trigo (*Triticum*, p. ej. *aestivum*), cebada (*Hordeum*, p. ej. *vulgare*), maíz (*Zea*, p. ej. *mays*), arroz (*Oryza*, p. ej. *sativa*), colza (*Brassica napus*), mijo (*Panicum L.*), girasol (*Helianthus annus*), avenas (*Avena sativa*), tubérculos, tales como colinabo (*Brassica*, p. ej. *oleraceae*), patata (*Solanum*, p. ej. *tuberosum*) y similares.

Se entiende que se pueden utilizar plantas adicionales así como sistemas de expresión no vegetales en el contexto de esta invención. La elección de la especie vegetal se determina principalmente por el uso pretendido de la planta o partes de la misma y la susceptibilidad de la especie vegetal a la transformación.

- 25 Se encuentran disponibles numerosas técnicas para la introducción del constructo de expresión que contiene la secuencia de ADN que codifica la fitasa en las plantas diana. Tales técnicas incluyen pero no están limitadas a la transformación de protoplastos utilizando el método de calcio/polietilenglicol, la electroporación y la microinjeción o el bombardeo con partículas (recubiertas) (Potrykus, 1990). Además de estos métodos denominados de transformación directa con ADN, se encuentran ampliamente disponibles sistemas de transformación que implican vectores, tales como vectores virales (p. ej. del Virus del Mosaico de la Coliflor (*CaMV*) y vectores bacterianos (p. ej. del género *Agrobacterium*) (Potrykus, 1990). Después de la selección y/o el escrutinio, se pueden regenerar los protoplastos, las células o partes de la planta que han sido transformados en plantas completas, utilizando métodos conocidos en la técnica (Horsch *et al.*, 1985). La elección de las técnicas de transformación y/o regeneración no es crítica para esta invención.

- 35 Para dicotiledóneas, una realización preferida de la presente invención utiliza el principio del sistema de vectores binario (Hoekema *et al.*, 1983; EP 0120516 Schilperoort *et al.*) en el que se emplean cepas de *Agrobacterium* que contienen un plásmido vir con los genes de la virulencia y un plásmido compatible que contiene el constructo génico que se va a transferir. Este vector puede replicar tanto en *E. coli* como en *Agrobacterium*, y deriva del vector binario Bin19 (Bevan, 1984) que resulta alterado en detalles que no son relevantes para esta invención. Los vectores binarios que se utilizan en este ejemplo contienen entre el límite izquierdo y el derecho secuencias del ADN-T, un gen NPTII idéntico que codifica la resistencia a la kanamicina (Bevan, 1984) y un sitio de clonación múltiple para clonar en los constructos génicos requeridos.

- 45 La transformación y regeneración de cultivos de monocotiledóneas no es un procedimiento convencional. Sin embargo, el reciente progreso científico demuestra que en principio las monocotiledóneas son susceptibles de transformación y que las plantas transgénicas fértiles pueden ser regeneradas a partir de células transformadas. El desarrollo de sistemas de cultivo de tejidos reproducibles para estos cultivos, junto con los potentes métodos de introducción de material genético en células vegetales han facilitado la transformación. En la actualidad los métodos de elección para la transformación de monocotiledóneas son el bombardeo con microproyectiles de explantes o células en suspensión, y la absorción directa de ADN o la electroporación de protoplastos. Por ejemplo, se han obtenido con éxito plantas de arroz transgénicas utilizando el gen hph bacteriano, que codifica la resistencia a la higromicina, como marcador de selección. El gen fue introducido mediante electroporación (Shimamoto *et al.*, 1993). Se han obtenido plantas de maíz transgénico introduciendo el gen bar de *Streptomyces hygroscopicus*, que codifica la fosfinotricin-acetiltransferasa (una enzima que inactiva el herbicida fosfinotricina), en células embrionarias de un cultivo en suspensión de maíz mediante bombardeo con micropartículas (Gordon-Kamm *et al.*, 1990). Se ha informado sobre la introducción de material genético en protoplastos de aleurona de otros cultivos de monocotiledóneas tales como trigo y cebada (Lee *et al.*, 1989). Se han regenerado plantas de trigo a partir de cultivos en suspensión embrionario seleccionando solamente los tejidos de callo embrionario compactos y nodulares maduros para el establecimiento de los cultivos en suspensión embrionario (Vasil *et al.*, 1972; Vasil *et al.*, 1974). La combinación con sistemas de transformación para estos cultivos permite la aplicación de la presente invención a monocotiledóneas. Estos métodos también se pueden aplicar a la transformación y regeneración de dicotiledóneas.

- 65 La expresión del constructo de fitasa implica detalles tales como la transcripción del gen por las polimerasas de la planta, la traducción del ARNm, etc. que son conocidos por los expertos en los mecanismos de las técnicas de ADN recombinante. Solo los detalles relevantes para la apropiada comprensión de esta invención se comentan más abajo. En la presente invención se pueden utilizar las secuencias reguladoras que se conocen o se ha descubierto que causan

la expresión de la fitasa. La elección de las secuencias reguladoras utilizadas depende del cultivo diana y/o del órgano diana de interés. Tales secuencias reguladoras se pueden obtener de plantas o virus de plantas, o se pueden sintetizar químicamente. Tales secuencias reguladoras son promotores activos en la dirección de la transcripción en plantas, ya sea constitutivamente o específicos de la fase y/o el tejido, dependiendo del uso de la planta o de una de sus partes.

- 5 Estos promotores incluyen, pero no están limitados a promotores que muestran expresión constitutiva, tales como el promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV) (Guilley *et al.*, 1982), aquellos para la expresión específica en hojas, tales como el promotor del gen de la subunidad pequeña de la ribulosa bisfósfato carboxilasa (Coruzzi *et al.*, 1984), aquellos para la expresión específica en raíces, tales como el promotor del gen de la glutamina sintasa (Tingey *et al.*, 1987), aquellos para la expresión específica en semillas, tales como el promotor A de la cruciferina de *Brassica napus* (Ryan *et al.*, 1989), aquellos para la expresión específica en tubérculos, tales como el promotor de patatina de clase I de la patata (Koster-Topfer *et al.*, 1989; Wenzler *et al.*, 1989) o aquellos para la expresión específica en frutos, tales como el promotor de la poligalacturonasa (PG) de tomate (Bird *et al.*, 1988).

Otras secuencias reguladoras tales como las secuencias terminadoras y las señales de poliadenilación incluyen 15 cualquiera de semejantes secuencias que funcionen como tales en plantas, cuya elección está a la altura del experto. Un ejemplo de tales secuencias es la región limítrofe 3' del gen de la nopalina sintasa (nos) de *Agrobacterium tumefaciens* (Bevan, *supra*). Las reguladoras también pueden incluir secuencias intensificadoras, tales como las encontradas en el promotor 35S de CaMV, y las secuencias estabilizadoras del ARNm tales como la secuencia líder de RNA4 del Virus del Mosaico de la Alfalfa (AlMV) (Brederode *et al.*, 1980) o cualquier otra secuencia que funcione de una manera similar.

20 La fitasa debe ser expresada en un entorno que permita la estabilidad de la proteína expresada. La elección de los compartimentos celulares, tales como el citosol, el retículo endoplásmico, la vacuola, el cuerpo proteico o el espacio periplásmico puede ser utilizada en la presente invención para crear semejante entorno estable, dependiendo de los 25 parámetros biofísicos de la fitasa. Tales parámetros incluyen, pero no están limitados a un pH óptimo, sensibilidad a las proteasas o sensibilidad a la molaridad del compartimento preferido.

Para obtener la expresión en el citoplasma de la célula, la enzima expresada no debe contener un péptido señal 30 secretor o cualquier otra secuencia diana. Para la expresión en cloroplastos y mitocondrias la enzima expresada debe contener el denominado péptido de tránsito específico para importar a estos orgánulos. Las secuencias de redireccionamiento que se pueden anclar a la enzima de interés con el fin de lograr esto son conocidas (Smeekens *et al.*, 1990; van den Broeck *et al.*, 1985; Wolter *et al.*, 1988). Si se desea actividad de la enzima en las vacuolas, tiene que estar 35 presente un péptido señal secretor, así como una secuencia de redireccionamiento específica que dirija la enzima a estas vacuolas (Tague *et al.*, 1990). Lo mismo se verifica para los cuerpos proteicos de las semillas. La secuencia de ADN que codifica la enzima de interés debe ser modificada de tal manera que la enzima pueda ejercer su acción en la locación de la célula deseada.

40 Para lograr la expresión extracelular de la fitasa, el constructo de expresión de la presente invención utiliza una secuencia señal secretora. Aunque se prefieren secuencias señal que son homólogas (nativas) para la especie anfitriona vegetal, también se pueden utilizar secuencias señal heterólogas, *es decir* aquellas que se originan a partir de otras especies vegetales y de origen microbiano. Tales secuencias señal son conocidas por los expertos en la técnica. Las secuencias señal apropiadas que se pueden utilizar en el contexto de la presente invención son descritas por Blobel *et al.*, 1979; Von Heijne, 1986; Garcia *et al.*, 1987; Sijmons *et al.*, 1990; Ng *et al.*, 1994; y Powers *et al.*, 1996).

45 Todas las partes de los constructos de ADN relevantes (promotores, secuencias reguladoras, secretoras, estabilizadoras, de redireccionamiento, o de terminación) de la presente invención pueden ser modificadas, si se desea, para influir en sus características de control utilizando los métodos conocidos por los expertos en la técnica. Se señala que las plantas que contienen fitasa obtenida por medio de la presente invención pueden ser utilizadas para obtener plantas u órganos de plantas con niveles de fitasa aún más elevados. Por ejemplo, puede ser posible obtener tales plantas u 50 órganos de plantas mediante el uso de mecanismos de variación somoclonal o mediante mecanismos de cruzamiento. Tales mecanismos son bien conocidos por los expertos en la técnica.

En una realización, la presente invención proporciona un método (y sus productos) para lograr un sistema de expresión al alta altamente eficaz para la fitasa y otras moléculas. En una realización preferida, la presente invención 55 proporciona un método (y sus productos) para lograr un sistema de expresión al alta altamente eficaz para la fitasa y la fosfatasa ácida de pH 2,5 en Trichoderma. Este sistema da como resultado composiciones de enzima que tienen una utilidad concreta en la industria de la alimentación animal. Los detalles adicionales referentes a este enfoque se encuentran en la literatura pública y/o son conocidos por el experto en la técnica. En una exemplificación no limitante concreta, semejante literatura asequible públicamente incluye EP 0659215 (WO 9403612 A1) (Nevalainen *et al.*), 60 aunque estas referencias no ilustran las moléculas inventivas de la presente solicitud.

En una realización, la presente invención proporciona un método (y sus productos) para producir formulaciones líquidas acuosas estabilizadas que tienen actividad fitasa que muestran un aumento de resistencia a la inactivación por calor de la actividad de la enzima y que conservan su actividad fitasa durante períodos de almacenamiento prolongados. Las formulaciones líquidas se estabilizan por medio de la adición de urea y/o un poliol tal como sorbitol y glicerol como agente estabilizante. También se proporcionan preparaciones alimenticias para animales monogástricos y métodos para su producción que resultan del uso de tales formulaciones líquidas acuosas estabilizadas. Los detalles adicionales referentes a este enfoque se encuentran en la literatura pública y/o son conocidos por los expertos en la téc-

ES 2 328 670 T3

nica. En una ejemplificación no limitante concreta, semejante literatura asequible públicamente incluye EP0626010 (WO 9316175 A1) (Barendse *et al.*), aunque las referencias de la literatura asequible públicamente no ilustran las moléculas inventivas de la presente solicitud.

5 En una realización, la presente invención proporciona un método para hidrolizar fitato que comprende poner en contacto el fitato con una o más de las moléculas novedosas de fitasa descritas en la presente memoria. Por lo tanto, la invención proporciona un método para catalizar la hidrólisis de fitato a inositol y fosfato libre con liberación de minerales desde el complejo de ácido fítico. El método incluye poner en contacto un sustrato de fitato con una cantidad eficaz degradante de una enzima de la invención. El término cantidad "eficaz degradante" hace referencia a la cantidad de enzima que se requiere para degradar al menos el 50% del fitato, en comparación el fitato que no está en contacto con la enzima. Preferiblemente, se degrada al menos el 80% del fitato.

10 15 En otra realización, la invención proporciona un método para hidrolizar enlaces fosfo-mono-ester en fitato. El método incluye administrar una cantidad eficaz de moléculas de fitasa de la invención para producir inositol y fosfato libre. Una cantidad "eficaz" hace referencia a la cantidad de enzima que es requerida para hidrolizar al menos el 50% de los enlaces fosfo-mono-ester, en comparación el fitato que no está en contacto con la enzima. Preferiblemente, al menos el 80% de los enlaces son hidrolizados.

20 En un aspecto particular, cuando se desea, las moléculas de fitasa se pueden utilizar combinadas con otros reactivos, tales como otros catalizadores; con el fin de efectuar cambios químicos (p. ej. hidrólisis) en las moléculas de fitato y/o en otras moléculas de la fuente o las fuentes se sustrato. De acuerdo con este aspecto, preferiblemente las moléculas de fitasa y los reactivos adicionales no se inhibirán entre sí, más preferiblemente las moléculas de fitasa y los reactivos adicionales tendrán un efecto aditivo global, y más preferiblemente aún las moléculas de fitasa y los reactivos adicionales tendrán un efecto sinérgico global.

25 Las fuentes relevantes de moléculas sustrato de fitato incluyen productos alimenticios, productos alimenticios potenciales, subproductos de productos alimenticios (tanto subproductos *in vitro* como subproductos *in vivo*, p. ej. productos de reacción *ex vivo* y productos excrementales de animales), precursores de productos alimenticios, y cualquier otra fuente material de fitato.

30 En un aspecto no limitante, la fitasa recombinante puede ser consumida por organismos y conserva la actividad tras el consumo. En otra ejemplificación, se pueden utilizar enfoques transgénicos para lograr la expresión de la fitasa recombinante - preferiblemente de una manera controlada (se encuentran disponibles métodos para controlar la expresión de moléculas transgénicas de una manera específica del tiempo y específica del tejido).

35 En una ejemplificación concreta, la actividad fitasa en el material de origen (p. ej. un origen vegetal transgénico o un anfitrión procariótico recombinante) puede ser incrementada tras el consumo; este incremento de la actividad se puede producir, por ejemplo, tras la conversión de una molécula de fitasa precursora en forma pro en una enzima significativamente más activa en una forma más madura, donde dicha conversión puede resultar, por ejemplo, de la 40 inyección y digestión de la fuente de fitasa. La hidrólisis del fitato sustrato se puede producir en cualquier momento después de poner en contacto la fitasa con el fitato; por ejemplo, ésta se puede producir antes de la inyección o después de la inyección o tanto antes como después de la inyección de sustrato o enzima o ambos. Adicionalmente se aprecia que el fitato sustrato se puede poner en contacto -además de con la fitasa- con uno o más reactivos adicionales, tales como otra enzima, que también se puede aplicar directamente o después de la purificación de su material de origen.

45 Se aprecia que el material o los materiales de origen de fitasa se pueden poner en contacto directamente con el material o los materiales de origen de fitato; p. ej, después de la trituración o la masticación *in vitro* o *in vivo* de la fuente o fuentes de fitasa y la fuente o fuentes de fitato. Alternativamente la enzima fitasa puede ser purificada de los materiales de origen, o el fitato sustrato puede ser purificado de cualquiera de los materiales de origen, o tanto la 50 enzima fitasa como el fitato sustrato pueden ser purificados de cualquiera de los materiales de origen antes de poner en contacto la enzima fitasa con el fitato sustrato. Se aprecia que se puede de utilizar una combinación de reactivos purificados y no purificados - incluyendo una o varias enzimas o uno o varios sustratos o ambos.

55 Se aprecia que se puede utilizar más de un material de origen como fuente de actividad fitasa. Esto resulta útil para lograr una liberación controlada de reactivo o reactivos a partir de los materiales de origen, en la que la liberación de los diferentes reactivos de sus materiales de origen se producen diferencialmente, por ejemplo a medida que los materiales de origen inyectados son digeridos *in vivo* o a medida que los materiales de origen son procesados en aplicaciones *in vitro*. El uso de más de un material de origen de actividad fitasa también es útil para obtener actividades fitasa en un intervalo de condiciones y fluctuaciones del mismo, que se pueden encontrar -tales como un intervalo de valores de pH, temperaturas, salinidades, e intervalos de tiempo- por ejemplo durante diferentes etapas de procesamiento de una aplicación. El uso de diferentes materiales de origen también es útil con el fin de obtener diferentes reactivos, como se ilustra mediante una o más formas o isómeros de fitasa y/o fitato y/u otros materiales.

60 65 Se aprecia que un único material de origen, tal como una especie de planta transgénica (o porciones de planta de la misma), puede ser un material de origen tanto de fitasa como de fitato; y que las enzimas y sustratos pueden ser compartimentados diferencialmente en dicha única fuente - p. ej. secretado vs. no secretado, expresado diferencialmente y/o con abundancias diferenciales en las diferentes porciones u órganos o tejidos de la planta o en compartimentos subcelulares de la misma porción u órgano o tejido de la misma planta. La purificación de las moléculas de fitasa con-

ES 2 328 670 T3

tenidas allí puede comprender el aislamiento y/o procesamiento adicional de una o más porciones u órganos o tejidos o compartimentos subcelulares deseables de la planta.

En un aspecto particular, esta invención proporciona un método para catalizar reacciones *in vivo* y/o *in vitro* utilizando 5 semillas que contienen cantidades incrementadas de enzimas. El método comprende añadir semillas de tipo no salvaje, transgénicas, preferiblemente en forma triturada, a una mezcla de reacción y permitir que las enzimas de las semillas aumenten la velocidad de reacción. Mediante la adición directa de las semillas a la mezcla de reacción el método proporciona una solución al procedimiento de extracción y purificación de la enzima más costoso y engorroso. También se proporcionan métodos de tratamiento por medio de los cuales se le administra a un organismo que carece 10 de suficiente carga de una enzima la enzima en forma de semillas de una o más especies vegetales, preferiblemente especies vegetales transgénicas, que contienen una mayor cantidad de la enzima. Los detalles adicionales referentes a este enfoque se encuentran en la literatura pública y/o son conocidos por el experto en la técnica. En una exemplificación no limitante concreta, semejante literatura asequible públicamente incluye el documento USPN 5.543.576 (Van Ooijen *et al.*) y el documento USPN 5.714.474 (Van Ooijen *et al.*), aunque estas referencias no ilustran las moléculas 15 inventivas de la presente solicitud y en su lugar ilustran el uso de fitasas fúngicas.

En un aspecto no limitante concreto, las presentes moléculas de fitasa son útiles para generar formas de vida del sistema digestivo recombinantes (o microbios o flora) y para la administración de dichas formas de vida recombinantes del sistema digestivo a animales. La administración se puede realizar opcionalmente sola o combinada con otras 20 enzimas y/u otras formas de vida que pueden proporcionar actividad enzimática en un sistema digestivo, donde dichas otras enzimas y dichas formas de vida pueden ser recombinantes o de otro tipo. Por ejemplo, la administración se puede realizar combinada con bacterias xilanolíticas.

En un aspecto no limitante, la presente invención proporciona un método para macerar granos de maíz o sorgo 25 en agua templada que contiene dióxido de azufre en presencia de una preparación de enzima que comprende una o más enzimas degradantes de fitina, preferiblemente en un cantidad tal que la fitina presente en el maíz o el sorgo es sustancialmente degradada. La preparación de enzima puede comprender fitasa y/o fosfatasa ácida y opcionalmente otras enzimas degradantes del material vegetal. El tiempo de maceración puede ser de 12 a 18 horas. La maceración puede ser interrumpida por una etapa de molienda intermedia, reduciendo el tiempo de maceración. En una realización 30 preferida, los granos de maíz o sorgo se maceran en agua templada que contiene dióxido de azufre en presencia de una preparación de enzima que incluye una o más enzimas degradantes de fitina, tales como fitasa y fosfatases ácidas, para eliminar o reducir enormemente el ácido fítico y las sales de ácido fítico. Los detalles adicionales referentes a este enfoque se encuentran en la literatura pública y/o son conocidos por el experto en la técnica. En una exemplificación no limitante concreta, semejante literatura asequible públicamente incluye el documento USPN 4.914.029 (Caransa 35 *et al.*) y el documento EP 0321004 (Vaara *et al.*), aunque estas referencias no ilustran las moléculas inventivas de la presente solicitud.

En un aspecto no limitante, la presente invención proporciona un método para obtener una masa de pan que tiene 40 propiedades físicas deseables tales como no pegajosidad y elasticidad y un pan producto de calidad superior por ejemplo de un volumen específico que comprende añadir moléculas de fitasa a la masa de pan. En una realización preferida, las moléculas de fitasa de la presente invención se añaden a una preparación para masa de pan en elaboración que es formada y cocida con posterioridad. Los detalles adicionales referentes a este enfoque se encuentran en la literatura pública y/o son conocidos por el experto en la técnica. En una exemplificación no limitante concreta, semejante literatura 45 disponible públicamente incluye JP 03076529 (Hara *et al.*), aunque esta referencia no ilustra las moléculas de fitasa inventivas de la presente solicitud.

En un aspecto no limitante, la presente invención proporciona un método para producir productos alimenticios de soja mejorados. Las habas de soja se combinan con moléculas de fitasa de la presente invención para separar el ácido fítico de las habas de soja, produciendo de este modo productos alimenticios de soja que tienen una carga mejorada 50 de nutrientes traza esenciales para los organismos consumidores y su digestibilidad de proteínas. En una realización preferida, en la producción de leche de soja, se añaden moléculas de fitasa de la presente invención o se ponen en contacto con habas de soja con el fin de reducir el contenido de ácido fítico. En una exemplificación no limitante, el procedimiento de aplicación puede ser acelerado agitando la leche de soja junto con la enzima con calentamiento o efectuando una reacción de tipo mezclado en un recipiente de agitación utilizando una enzima inmovilizada. Los 55 detalles adicionales referentes a este enfoque se encuentran en la literatura pública y/o son conocidos por el experto en la técnica. En una exemplificación no limitante concreta, semejante literatura públicamente asequible incluye JP 59166049 (Kamikubo *et al.*), aunque esta referencia no ilustra las moléculas inventivas de la presente solicitud.

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para producir un producto mezclado para agua de 60 bebida o alimento para animales en forma líquida, y que comprende utilizar mezclas minerales y mezclas de vitaminas, y también moléculas novedosas de fitasa de la presente invención. En una realización preferida, se obtiene una mezcla correctamente dosificada y compuesta de nutrientes necesarios para el organismo consumidor sin riesgo alguno de precipitación y destrucción de minerales/vitaminas importantes, al mismo tiempo que se hace un uso óptimo del fosfato unido a fitina en el alimento. Los detalles adicionales referentes a este enfoque se encuentran en la literatura pública 65 y/o son conocidos por el experto en la técnica. En una exemplificación no limitante concreta, semejante literatura públicamente disponible incluye el documento EP 0772978 (Bendixen *et al.*), aunque esta referencia no ilustra las moléculas inventivas de la presente solicitud.

ES 2 328 670 T3

Se aprecia que las moléculas de fitasa de la presente invención también se pueden utilizar para producir otros productos alimenticios bebibles (o bebidas) alcohólicos o no alcohólicos basados en el uso de mohos y/o cereales y/u otras plantas. Estos productos alimenticios bebibles incluyen licores, vinos, bebidas alcohólicas mixtas (p. ej. bebidas refrescantes a base de vino, otros cafés alcohólicos tales como café Irlandés, etc.), cervezas, cervezas con bajo

- 5 contenido de alcohol, zumos, extractos, productos homogeneizados, y purés. En una exemplificación preferida, las moléculas de fitasa descritas en la presente se utilizan para generar versiones transgénicas de mohos y/o cereales y/u otras plantas útiles para la producción de tales productos alimenticios bebibles. En otra exemplificación preferida, las moléculas de fitasa descritas en la presente se utilizan como ingredientes adicionales en el procedimiento de fabricación y/o en el contenido final de tales productos alimenticios bebibles. Los detalles adicionales referentes a 10 este enfoque se encuentran disponibles en la literatura pública y/o son conocidos por el experto en la técnica. Sin embargo -debido a la novedad de la presente invención- las referencias en la literatura públicamente disponible no ilustran las moléculas inventivas descritas en la presente.

En otra exemplificación no limitante, la presente invención proporciona un medio para obtener sake refinado que 15 tiene una cantidad reducida de fitina y un contenido incrementado de inositol. Tal sake puede tener -por medio de efectos directos y/o psicogénicos- una acción preventiva sobre una enfermedad hepática, arteriosclerosis, y otras enfermedades. En una realización preferida, se produce un sake a partir de arroz Koji multiplicando el moho Koji del arroz que tiene una elevada actividad fitasa como materia prima. Se aprecia que las moléculas de fitasa de la presente invención se pueden utilizar para producir u moho útil con una actividad intensificada (preferiblemente un moho transgénico) y/o añadirlas exógenamente para aumentar los efectos del moho Koji. La cepa se añade al arroz hervido y se produce Koji mediante un procedimiento convencional. En una exemplificación preferida, se utiliza el Koji preparado, el arroz completo se prepara en dos fases y se produce el Sake a una temperatura de Sake constante de 15°C para dar el Sake refinado objetivo que tiene una cantidad reducida de fitina y una cantidad incrementada de inositol. Los 20 detalles adicionales referentes a este enfoque se encuentran en la literatura pública y/o son conocidos por el experto en la técnica. En una exemplificación no limitante concreta, semejante literatura públicamente disponible incluye JP 06153896 (Soga *et al.*) y JP 06070749 (Soga *et al.*), aunque estas referencias no ilustran las moléculas inventivas de la 25 presente solicitud.

En un aspecto no limitante, la presente invención proporciona un método para obtener un absorbefaciente capaz de 30 promover la absorción de minerales incluyendo el calcio ingerido sin ser digeridos por los jugos gástricos o los jugos intestinales a un bajo coste. En una realización preferida, dicho absorbefaciante de minerales contiene un producto hidrolizado parcial de ácido fítico como ingrediente activo. Preferiblemente, el producto hidrolizado parcial de ácido fítico es producido mediante hidrólisis de ácido fítico o sus sales utilizando las moléculas de fitasa novedosas de la 35 presente invención. El tratamiento con dichas moléculas de fitasa se puede producir mediante tratamiento solo y/o combinado (para inhibir o aumentar el efecto final), y está seguido de la inhibición de la hidrólisis en un intervalo con el fin de no liberar todos los radicales fosfato. Los detalles adicionales referentes a este enfoque se encuentran en la literatura pública y/o son conocidos por el experto en la técnica. En una exemplificación no limitante concreta, semejante literatura públicamente disponible incluye JP 04270296 (Hoshino), aunque la referencia en la literatura 40 públicamente disponible no ilustra las moléculas inventivas de la presente solicitud.

En un aspecto no limitante, la presente invención proporciona un método (y los productos del mismo) para producir 45 una composición de enzima que tiene un aditivo o preferiblemente una actividad hidrolizadora de fitato sinérgica; dicha composición comprende moléculas novedosas de fitasa de la presente invención y uno o más reactivos adicionales para lograr una composición que es útil para un tratamiento combinado. En una realización preferida, el tratamiento combinado de la presente invención se logra con el uso de al menos dos fitasas de diferente especificidad de posición, *es decir* cualquiera de las combinaciones de fitasas 1, 2, 3, 4, 5, y 6. Combinando fitasas de diferente especificidad de posición se obtiene un efecto aditivo o sinérgico. Las composiciones tales como comidas y alimentos o aditivos para comidas y alimentos que comprenden tales fitasas combinadas también están incluidas en esta invención como los procedimientos para su preparación. Los detalles adicionales referentes a este enfoque se encuentran en la literatura 50 pública y/o son conocidos por el experto en la técnica. En una exemplificación no limitante concreta, semejante literatura públicamente disponible incluye el documento WO 9830681 (Ohmann *et al.*), aunque las referencias de la literatura públicamente disponible no ilustran el uso de las moléculas inventivas de la presente solicitud.

En otra realización preferida, el tratamiento combinado de la presente invención se logra con el uso de una fosfatasa 55 ácida que tiene actividad hidrolizadora de fitato a un pH de 2,5, a una baja proporción correspondiente a un perfil de actividad de pH de 2,5:5,0 de aproximadamente 0,1:1,0 a 10:1, preferiblemente de aproximadamente 0,5:1,0 a 5:1, aún más preferiblemente de aproximadamente 0,8:1,0 a 3:1, y más preferiblemente aún de aproximadamente 0,8:1,0 a 2:1. Dicha composición enzimática presenta preferiblemente una eficacia hidrolizadora de fitato sinérgica superior por medio de tratamiento térmico. Dicha composición enzimática es útil en el tratamiento de productos 60 alimenticios (comida bebible y sólida, alimentos y productos de forraje) para mejorar la hidrólisis del fitato. Los detalles adicionales referentes a este enfoque se encuentran en la literatura pública y/o son conocidos por el experto en la técnica. En una exemplificación no limitante concreta, semejante literatura públicamente disponible incluye el documento USPN 5.554.399 (Vanderbeke *et al.*) y el documento USPN 5.443.979 (Vanderbeke *et al.*), aunque estas referencias no ilustran el uso de las moléculas inventivas de la presente solicitud, si no que en su lugar ilustran el uso 65 de fitasas fúngicas (en particular *Aspergillus*).

En un aspecto no limitante, la presente invención proporciona un método (y los productos del mismo) para producir una composición que comprende la presente enzima que actúa sobre fitato novedosa combinada con una o más enzimas

ES 2 328 670 T3

adicionales que actúan sobre polisacáridos. Tales polisacáridos se puede seleccionar del grupo que consiste en arabinanos, fructanos, fucanos, galactanos, galacturonanos, glucanos, mananos, xilanios, levanos, fucoidano, carragenano, galactocarolosa, pectina, ácido péctico, amilosa, pullulano, glicógeno, amilopectina, celulosa, carboxilmethylcelulosa, hidroxipropil-metilcelulosa, dextrano, pustulano, quitina, agarosa, queratano, condroitina, dermatano, ácido hialurónico, 5 ácido algínico, y polisacáridos que contienen al menos una aldosa, cetosa, ácido o amina seleccionados del grupo que consiste en eritrosa, treosa, ribosa, arabinosa, xirosa, lirosa, alosa, altrosa, glucosa, manosa, gulosa, idosa, galactosa, talosa, eritrulosa, ribulosa, xitolosa, psicosa, fructosa, sorbosa, tagatosa, ácido glucurónico, ácido glucónico, 10 ácido gluárico, ácido galacturónico, ácido manurónico, glucosamina, galactosamina y ácido neuramínico.

10 En un aspecto particular, la presente invención proporciona un método (y los productos del mismo) para producir una composición que tiene actividad hidrolizadora de fitato sinérgica que comprende una o más moléculas novedosas de fitasa de la presente invención, una celulasa (incluyendo preferiblemente pero no exclusivamente una xilanasa), opcionalmente una proteasa, y opcionalmente uno o más reactivos adicionales. En realizaciones preferidas, tales tratamientos combinados son útiles en el tratamiento de productos alimenticios, productos de la madera, tales como 15 productos de papel, y como soluciones y sólidos de limpieza.

En una ejemplificación no limitante, las presentes moléculas de fitasa son útiles combinadas con los componentes 20 del celulosoma. Se sabe que las celulasas de muchas bacterias celulolíticas se organizan en complejos multienzimáticos discretos, denominados celulosomas. Las múltiples subunidades de celulosomas están compuestas por numerosos 25 dominios funcionales, que interaccionan entre sí y con el sustrato celulósico. Una de estas subunidades comprende una nueva clase característica de polipéptidos de andamiaje no catalíticos, que integra selectivamente las diversas subunidades de celulasa y xilanasa en el complejo cohesivo. La aplicación inteligente de híbridos de celulosoma y constructos químéricos de dominios de celulosoma debe permitir un mejor uso de la biomasa celulósica y puede ofrecer una amplia gama de aplicaciones novedosas en la investigación, la medicina y la industria.

25 En otra ejemplificación no limitante, las presentes moléculas de fitasa son útiles -ya sea solas o en tratamientos combinados- en los campos de la producción de pasta de papel mediante métodos biológicos y blanqueo de pasta de papel mediante métodos biológicos donde se desea una reducción en el uso de productos químicos medioambientalmente utilizados tradicionalmente en la industria de la pasta de papel y el papel. El tratamiento de las aguas 30 residuales representa otro extenso campo de aplicación donde las enzimas biológicas han demostrado ser eficaces no sólo en la eliminación del color si no también en la bioconversión de sustancias potencialmente nocivas en productos biológicos útiles.

35 En otra ejemplificación no limitante, las presentes moléculas de fitasa son útiles para generar formas de vida que pueden proporcionar al menos una actividad enzimática -ya sea solas o en tratamientos combinados- en el tratamiento de sistemas digestivos de organismos. Los organismos particularmente relevantes a tratar incluyen organismos no rumiantes. Específicamente, se aprecia que este enfoque se puede realizar solo o combinado con otras moléculas 40 biológicas (por ejemplo, xilanásas) para generar un anfitrión recombinante que expresa una pluralidad de moléculas biológicas. También se aprecia que la administración de las presentes moléculas de fitasa y/o anfitriones recombinantes que expresan las presentes moléculas de fitasa se puede realizar sola o combinada con otras moléculas biológicas, y/o 45 formas de vida que pueden proporcionar actividades enzimáticas en un sistema digestivo - donde dichas otras enzimas y dichas formas de vida pueden ser recombinantes o de otro tipo. Por ejemplo, la administración se puede realizar combinada con bacterias xilanolíticas.

50 Por ejemplo, además de fitato, muchos organismos también son incapaces de digerir adecuadamente las hemicelulosas. Las hemicelulosas o xilanios son los componentes principales (35%) de los materiales vegetales. Para los animales rumiantes, aproximadamente el 50% de los xilanios dietéticos son degradados, pero sólo se degradan pequeñas cantidades de xilanios en el intestino inferior de los animales no rumiantes y los humanos. En el rumen, las principales especies xilanolíticas son *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Bacteroides ruminicola*. En el colon humano, *Bacteroides ovatus* y *Bacteroides fragilis* subspecies "a" son las principales bacterias xilanolíticas. Los xilanios son químicamente complejos, y su degradación requiere múltiples enzimas. La expresión de estas enzimas por las bacterias del intestino varía 55 enormemente entre especies. *Butyrivibrio fibrisolvens* elabora xilanásas extracelulares pero la especie *Bacteroides* tiene una actividad xilanasa ligada a la célula. La caracterización bioquímica de las enzimas xilanolíticas de bacterias del intestino no se ha realizado completamente. Se ha clonado un gen de xilosidasa a partir de *B. fibrisolvens* 113. Los datos de las hibridaciones de ADN utilizando un gen de xilanasa clonado de *B. fibrisolvens* 49 indican que este gen puede estar presente en otras cepas de *B. fibrisolvens*. Se transfirió un xilanasa de *Bact. ruminicola* y fue altamente expresada en *Bact. fragilis* y *Bact. uniformis*. Se han clonado genes de arabinosidasa y xilosidasa de *Bact. ovatus* y ambas actividades parecen estar catalizadas por una única enzima novedosa, bifuncional.

60 Por lo tanto, se aprecia que las presentes moléculas de fitasa son útiles para 1) transferirlas a un anfitrión adecuado (tal como *Bact. fragilis* o *Bact. uniformis*); 2) lograr la expresión adecuada en un anfitrión recombinante resultante; y 3) administrar dicho anfitrión recombinante a organismos para mejorar la capacidad de los organismos tratados para degradar el fitato. La investigación continuada en los campos de la genética y la bioquímica proporcionarán conocimiento y entendimiento para la manipulación de la digestión en el intestino y una mejor comprensión de la 65 digestión de la fibra colónica.

Los detalles adicionales referentes a este enfoque se encuentran en la literatura pública y/o son conocidos por el experto en la técnica. En una ejemplificación no limitante concreta, semejante literatura públicamente disponible

ES 2 328 670 T3

incluye el documento USPN 5.624.678 (Bedford *et al.*), el documento USPN 5.683.911 (Bodie *et al.*), el documento USPN 5.720.971 (Beauchemin *et al.*), el documento USPN 5.759.840 (Sung *et al.*), el documento USPN 5.770.012 (Cooper), el documento USPN 5.786.316 (Baeck *et al.*), el documento USPN 5.817.500 (Hansen *et al.*), y los artículos de revistas (Jeffries, 1996; Prade, 1996; Bayer *et al.*, 1994; Duarte *et al.*, 1994; Hespell & Whitehead, 1990; Wong *et al.*, 1988), aunque estas referencias no ilustran las moléculas de fitasa inventivas de la presente solicitud, ni ilustran la adición de moléculas de fitasa en la producción de productos alimenticios, productos de la madera, tales como productos de papel, y como soluciones y sólidos de limpieza. En contraste, la presente invención ilustra que las moléculas de fitasa -preferiblemente las moléculas de fitasa inventivas de la presente solicitud- se pueden añadir al reactivo o los reactivos descritos con el fin de obtener preparaciones que tienen una actividad fitasa adicional. Preferiblemente, dicho reactivo o reactivos las moléculas de fitasa adicionales y no se inhibirán entre sí, más preferiblemente dicho reactivo o reactivos las moléculas de fitasa adicionales tendrán un efecto aditivo global, y más preferiblemente aún dicho reactivo o reactivos las moléculas de fitasa adicionales tendrán un efecto sinérgico global.

5 aunque estas referencias no ilustran las moléculas de fitasa inventivas de la presente solicitud, ni ilustran la adición de moléculas de fitasa en la producción de productos alimenticios, productos de la madera, tales como productos de papel, y como soluciones y sólidos de limpieza. En contraste, la presente invención ilustra que las moléculas de fitasa -preferiblemente las moléculas de fitasa inventivas de la presente solicitud- se pueden añadir al reactivo o los reactivos descritos con el fin de obtener preparaciones que tienen una actividad fitasa adicional. Preferiblemente, dicho reactivo o reactivos las moléculas de fitasa adicionales y no se inhibirán entre sí, más preferiblemente dicho reactivo o reactivos las moléculas de fitasa adicionales tendrán un efecto aditivo global, y más preferiblemente aún dicho reactivo o reactivos las moléculas de fitasa adicionales tendrán un efecto sinérgico global.

10

15 Un método (y los productos del mismo) para mejorar la utilización de fósforo del fitato y el tratamiento y la preventión de la discondroplasia tibial en animales, concretamente en la volatería, incluye administrar a los animales una composición alimenticia que contiene un derivado de vitamina D₃ hidroxilado. El derivado de vitamina D₃ se administra preferiblemente a los animales en un alimento que contiene niveles reducidos de calcio y fósforo para potenciar la utilización del fósforo del fitato. Por lo tanto, el derivado de vitamina D₃ se administra preferiblemente combinado con las moléculas novedosas de fitasa de la presente invención para una potenciación adicional del fósforo del fitato. Los 20 detalles adicionales referentes a este enfoque se encuentran en la literatura pública y/o son conocidos por el experto en la técnica. En una exemplificación no limitante concreta, semejante literatura públicamente disponible incluye el documento USPN 5.516.525 (Edwards *et al.*) y el documento USPN 5.366.736 (Edwards *et al.*), el documento USPN 5.316.770 (Edwards *et al.*) aunque estas referencias no ilustran las moléculas inventivas de la presente solicitud.

25 En un aspecto no limitante, la presente invención proporciona un método (y los productos del mismo) para obtener productos alimenticios que 1) comprenden fitina que es fácilmente absorbida y utilizada en forma de inositol en el cuerpo de un organismo; 2) que es capaz de reducir el fósforo en la materia excremental; y 3) que es por lo tanto útil para mejorar la contaminación medioambiental. Dichos productos alimenticios comprenden una mezcla de un cereal que contiene fitina, un microorganismo productor de ácido láctico, y una molécula de fitasa novedosa de la presente 30 invención. En una realización preferida, dichos productos alimenticios son producidos componiendo un cereal que contiene fitina (preferiblemente, p. ej. salvado de arroz) con un grupo microbiano eficaz que tiene una propiedad acidófila, que produce ácido láctico, sin producir ácido butírico, libre de patogenicidad, y una fitasa. Los ejemplos del grupo microbiano eficaz incluyen p. ej. *Streptomyces sp.* (ATCC 3004) perteneciente al grupo de Actinomycetes y *Lactobacillus sp.* (IFO 3070) pertenecientes al grupo de los lactobacilos. Adicionalmente, una cantidad preferible 35 de adición de un grupo microbiano eficaz es de 0,2% en peso en términos de peso corporal bacteriano basándose en el material de cereal. Además, la cantidad de adición de fitasa es preferiblemente de 1-2% en peso basándose en la fitina del material cereal. Los detalles adicionales referentes a este enfoque se encuentran en la literatura pública y/o son conocidos por el experto en la técnica. En una exemplificación no limitante concreta, semejante literatura 40 públicamente disponible incluye JP 08205785 (Akahori *et al.*), aunque las referencias de la literatura públicamente asequible no ilustran las moléculas inventivas de la presente solicitud.

En un aspecto no limitante, la presente invención proporciona un método para mejorar la solubilidad de las proteínas vegetales. Más específicamente, la invención se refiere a métodos para la solubilización de proteínas en fuentes de proteína vegetal, cuyos métodos comprenden tratar la fuente de proteína vegetal con una cantidad eficaz de una o más enzimas fitasa -incluyendo las moléculas de fitasa de la presente invención- y tratar la fuente de proteína vegetal con una cantidad eficaz de una o más enzimas proteolíticas. En otro aspecto, la invención proporciona aditivos para alimentos animales que comprenden una fitasa y una o más enzimas proteolíticas. Los detalles adicionales referentes a este enfoque se encuentran en la literatura pública y/o son conocidos por el experto en la técnica. En una exemplificación no limitante concreta, semejante literatura 45 públicamente disponible incluye el documento EP 0756457 (WO 9528850 A1) (Nielsen y Knap), aunque las referencias de la literatura públicamente disponible no ilustran las moléculas inventivas de la presente solicitud.

50 En un aspecto no limitante, la presente invención proporciona un método para producir una preparación de proteína de una planta que comprende dispersar los materiales fuente de proteína vegetal en agua a un pH en el intervalo de 2 a 6 y mezclar las moléculas de fitasa de la presente invención. El extracto ácido que contiene la proteína soluble se separa y se seca para producir una proteína sólida de carácter deseable. También se pueden utilizar una o más proteasas para mejorar las características de la proteína. Los detalles adicionales referentes a este enfoque se encuentran en la literatura pública y/o son conocidos por el experto en la técnica. En una exemplificación no limitante concreta, semejante literatura 55 55 públicamente disponible incluye el documento USPN 3.966.971 (Morehouse *et al.*), aunque las referencias de la literatura públicamente disponible no ilustran las moléculas inventivas de la presente solicitud.

En un aspecto no limitante, la presente invención proporciona un método (y los productos del mismo) para activar el fósforo inerte del suelo y/o el compost, para mejorar la velocidad de utilización de un compuesto nitrogenado, y para suprimir la propagación de mohos patógenos añadiendo tres reactivos, fitasa, saponina y quitosana, al compost. En una 60 realización no limitante el método puede comprender tratar el compost por medio de 1) la adición de microorganismos que contienen fitasa al medio -preferiblemente anfitriones recombinantes que expresan al alza las moléculas novedosas de fitasa de la presente invención- p. ej. 100 ml de medio/100 kg compost húmedo; 2) alternativamente la adición también de una fuente vegetal que contiene fitasa -tal como salvado de trigo- p. ej. de 0,2 a 1 kg/100 kg compost

ES 2 328 670 T3

húmedo; 3) la adición de una fuente que contiene saponina -tal como turba, artemisas y plantas de yuca- p. ej. de 0,5 a 3,0 g/kg; 4) la adición de materiales que contienen quitosana -tales como conchas pulverizadas de camarones, cangrejos, etc.- p. ej. de 100 a 300 g/kg de compost húmedo. En otra realización no limitante, se utilizan fuentes recombinantes de los tres reactivos, fitasa, saponina, y quitosana. Los detalles adicionales referentes a este enfoque se encuentran en la literatura pública y/o son conocidos por el experto en la técnica. En una ejemplificación no limitante concreta, semejante literatura públicamente disponible incluye el documento JP 07277865 (Toya Taisuke), aunque las referencias de la literatura públicamente disponible no ilustran las moléculas inventivas de la presente solicitud.

Se pueden utilizar fragmentos del gen completo de la presente invención como sonda de hibridación para una 10 genoteca de ADNc o genómica para aislar el ADN completo y para aislar otros ADN que tienen una elevada similitud de secuencia con el gen o una actividad biológica similar. Las sondas de este tipo tienen al menos 10, preferiblemente al menos 15, y incluso más preferiblemente al menos 30 bases y pueden contener, por ejemplo, al menos 50 o más bases. La sonda también se puede utilizar para identificar un clon de ADN correspondiente a un transcripto completo y 15 un clon o clones genómicos que contienen el gen completo incluyendo regiones reguladoras y promotoras, exones, e intrones.

En los métodos para identificar moléculas de ácido nucleico que codifican miembros de la familia del polipéptido fitasa además del SEQ ID NO: 1, se escruta una muestra, p. ej., una genoteca de ácido nucleico, tal como una 20 genoteca de ADNc, que contiene un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fitasa con una sonda específica de fitasa, p. ej., una sonda de ácido nucleico específica de fitasa. Las sondas de ácido nucleico específicas de fitasa son moléculas de ácido nucleico (p. ej., moléculas que contienen nucleótidos de ADN o ARN, o sus combinaciones 25 o modificaciones) que hibridan específicamente con los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de fitasa, o sus secuencias complementarias. El término "sonda específica de fitasa", en el contexto de este método, hace referencia a sondas que se unen a ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de fitasa, o a sus secuencias complementarias, en un grado detectablemente mayor que a los ácidos nucleicos que codifican otras enzimas, o a sus secuencias 30 complementarias.

El método facilita la producción de sondas de ácido nucleico específicas de fitasa. Los métodos para obtener tales 35 sondas se puede diseñar basándose en la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1. Las sondas, que pueden contener al menos 12, p. ej., al menos 15, 25, 35, 50, 100, o 150 nucleótidos, se pueden producir utilizando cualquiera de los numerosos métodos convencionales (véase, p. ej., Ausubel *et al.*, *supra*). Por ejemplo, preferiblemente, las sondas se generan utilizando métodos de amplificación por PCR. En estos métodos, se diseñan cebadores que corresponden a secuencias conservadas de fitasa (véase la Figura 1), que pueden incluir aminoácidos específicos de fitasa, y el producto resultante de la PCR se utiliza como sonda para escrutar una genoteca de ácido nucleico, tal como una 40 genoteca de ADNc.

Este método se puede utilizar para aislar secuencias de ácido nucleico sustancialmente similares a la molécula de ácido nucleico aislada que codifica una enzima fitasa descrita en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1). Las secuencias de ácido 45 nucleico aisladas son sustancialmente similares si: (i) son capaces de hibridar en condiciones restrictivas, descritas más adelante, con el SEQ ID NO: 1; o (ii) codifican un polipéptido de fitasa como se muestra en el SEQ ID NO: 2 debido a la degeneración del código genético (p. ej., degenerado con respecto al SEQ ID NO: 1).

Las secuencias degeneradas de ADN codifican la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 2, pero tienen variaciones 50 en la secuencia de nucleótidos codificantes. Según se utiliza en la presente memoria, "sustancialmente similar" hace referencia a las secuencias que tienen una identidad similar a las secuencias de la presente invención. Las secuencias de nucleótidos que son sustancialmente similares se pueden identificar mediante hibridación o mediante comparación de la secuencia. Las secuencias enzimáticas que son sustancialmente similares se pueden identificar mediante uno o más de los siguientes: digestión proteolítica, electroforesis en gel y/o microsecuenciación.

Un medio para aislar una molécula de ácido nucleico que codifica una enzima fitasa consiste en sondear una 55 genoteca genómica de genes con una sonda natural o diseñada artificialmente utilizando procedimientos reconocidos en la técnica (véase, p. ej., Ausubel *et al.*, *supra*). Un experto en la técnica apreciará que el SEQ ID NO: 1, o sus fragmentos (que comprenden al menos 15 nucleótidos contiguos), es una sonda particularmente útil. Otras sondas particularmente útiles para este fin son los fragmentos hibridables a las secuencias del SEQ ID NO: 1 (es decir, que comprenden al menos 15 nucleótidos contiguos).

También se aprecia que tales sondas pueden estar y preferiblemente están marcadas con un reactivo analíticamente 60 detectable para facilitar la identificación de la sonda. Los reactivos útiles incluyen pero no están limitados a radiactividad, colorantes fluorescentes o enzimas capaces de catalizar la formación de un producto detectable. Las sondas son por tanto útiles para aislar copias complementarias ADN de otras fuentes animales o para escrutar tales fuentes en busca de secuencias relacionadas.

Con respecto a las secuencias de ácido nucleico que hibridan con las secuencias de ácido nucleico específicas descritas en la presente memoria, la hibridación se puede llevar a cabo en condiciones de restricción reducida, restricción 65 media o incluso condiciones restrictivas. Como ejemplo de hibridación de oligonucleótidos, primero se pre-hibrida una membrana polimérica que contiene ácido nucleico desnaturalizado inmovilizado durante 30 minutos a 45°C en una solución que consiste en NaCl 0,9 M, NaH₂PO₄ 50 mM, pH 7,0, Na₂EDTA 5,0 mM, SDS al 0,5%, 10X Denhardt, y 0,5 mg/mL de ácido polirriboadenílico. Después se añaden aproximadamente 2 X 10⁷ cpm (actividad específica 4-

ES 2 328 670 T3

9 X 10⁸ cpm/μg) de sonda oligonucleotídica marcada en el extremo con P³² a la solución. Después de 12-16 horas de incubación, la membrana se lava durante 30 minutos a la temperatura ambiente en 1X SET (NaCl 150 mM, Tris hidrocloruro 20 mM, pH 7,8, Na₂EDTA 1 mM) que contiene SDS al 0,5%, seguido de un lavado de 30 minutos en 1X SET de nueva aportación a Tm-10°C para la sonda oligonucleotídica. Después la membrana se expone a una película auto-radiográfica para la detección de las señales de hibridación.

Las moléculas de ácido nucleico de la invención se pueden utilizar como moldes en métodos convencionales para la producción de productos génicos de fitasa (p. ej., ARN de fitasa y polipéptidos de fitasa). Además, las moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos de fitasa (y sus fragmentos) y los ácidos nucleicos relacionados -tales como (1) los ácidos nucleicos que contienen secuencias que son complementarias a, o que hibridan con, ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de fitasa, o sus fragmentos (p. ej., fragmentos que contienen al menos 12, 15, 20, o 25 nucleótidos); y (2) los ácidos nucleicos que contienen secuencias que hibridan con secuencias que son complementarias a ácidos nucleicos que codifican polipéptidos de fitasa, o sus fragmentos (p. ej., fragmentos que contienen al menos 12, 15, 20, o 25 nucleótidos)- pueden ser utilizados en métodos centrados en sus propiedades de hibridación. Por ejemplo, como se describe con detalle en la presente memoria, semejantes moléculas de ácido nucleico pueden ser utilizadas en los siguientes métodos: métodos de PCR para sintetizar ácidos nucleicos de fitasa, métodos para detectar la presencia de un ácido nucleico de fitasa en una muestra, métodos de escrutinio para identificar ácidos nucleicos que codifican nuevos miembros de la familia de la fitasa. Los usos basados en la hibridación incluyen los de tipo Southern, los de tipo Northern, la protección de ARN, y cualquier procedimiento de hibridación en el que se utiliza un ácido nucleico como compañero de hibridación.

Los fragmentos o porciones de los polinucleótidos de la presente invención se pueden utilizar para sintetizar los polinucleótidos completos de la presente invención. Por lo tanto, los fragmentos o porciones de las enzimas de la presente invención se pueden emplear para producir la correspondiente enzima completa mediante síntesis peptídica; por lo tanto, los fragmentos se pueden emplear como intermedios para producir las enzimas completas. La separación por tamaños de los fragmentos escindidos se lleva a cabo generalmente utilizando gel de poliacrilamida al 8 por ciento como se describe en la literatura (p. ej. Goeddel *et al.*, 1980).

Las presentes enzimas, así como sus fragmentos, otros derivados, y análogos de las mismas y los correspondientes nucleótidos se pueden utilizar en la evolución dirigida. El descubrimiento y uso de una pluralidad de moldes como los descritos en la presente memoria puede aumentar significativamente el rendimiento potencial de la evolución dirigida en comparación con la evolución dirigida de una única proteína molde. Por tanto, la necesidad del descubrimiento se basa en la premisa de que la naturaleza proporciona una abundancia de rasgos potencialmente inalcanzables o impredecibles en miembros distintos pero relacionados de agrupamientos moleculares, y que la explotación de estos rasgos puede facilitar enormemente la evolución dirigida. De este modo, las moléculas relacionadas pero distintas pueden servir como molde de partida únicos para la evolución dirigida de una característica deseada. Alternativamente, pueden servir como depósitos de información de estructura-función incluyendo, pero no limitados a, una variedad de motivos consenso. Ambas utilidades ayudan a obviar la tarea poco práctica logísticamente de explorar de una vez una gama demasiado amplia de permutaciones mutacionales en cualquier molécula dada. Por ejemplo, la gama completa de permutaciones mutacionales en una proteína de 100 aminoácidos incluye más de 10¹³⁰ posibilidades (suponiendo que existen 20 posibilidades de aminoácidos en cada posición), un número demasiado grande para la consideración práctica.

Por lo tanto, particularmente debido a restricciones logísticas y técnicas, es un enfoque deseable -en la realización de la "evolución dirigida"- para descubrir y hacer uso de una pluralidad de moldes de partida relacionados que tienen diferencias pre-evolucionadas. Estos moldes se pueden someter después a una variedad de manipulaciones mutagénicas incluyendo, a modo de ejemplificación no limitante, mutagénesis de ADN y desarrollo de enzimas combinatorio, un enfoque que se elabora adicionalmente en el documento co-pendiente USPN 5.830.696 (Short *et al.*).

Las actividades enzimáticas de las moléculas novedosas generadas pueden ser escrutadas mediante una variedad de métodos incluyendo, a modo de ejemplificación no limitante: a) bioinmunopurificación molecular; b) escrutinio de clones recombinantes; y c) escrutinio de extractos.

Las presentes enzimas, así como sus fragmentos, otros derivados, y análogos, y las células que las expresan se pueden utilizar como inmunógeno para producir anticuerpos para éstas. Estos anticuerpos pueden ser, por ejemplo, anticuerpos policlonales o monoclonales. Se incluyen los anticuerpos químéricos, de cadena sencilla, y humanizados, así como los fragmentos Fab, o el producto de una genoteca de expresión Fab. Se pueden utilizar los diversos procedimientos conocidos en la técnica para la producción de tales anticuerpos y fragmentos.

Los anticuerpos generados contra las enzimas correspondientes a una secuencia de la presente invención se pueden obtener mediante inyección directa de las enzimas en un animal o mediante administración de las enzimas a un animal, preferiblemente no humano. El anticuerpo así obtenido se unirá después a las enzimas por sí mismo. De esta manera, se puede utilizar incluso una secuencia que codifica sólo un fragmento de las enzimas para generar anticuerpos que se unen a las enzimas nativas completas. Tales anticuerpos se pueden utilizar después para aislar la enzima de las células que expresan esa enzima.

Para la preparación de anticuerpos monoclonales, se puede utilizar cualquier técnica que proporcione anticuerpos producidos por cultivos continuos de líneas celulares. Los ejemplos incluyen la técnica del hibridoma (Kohler y Mils-

tein, 1975), la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de células B humanas (Kozbor *et al.*, 1983), y la técnica del hibridoma-EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al.*, 1985, págs. 77-96).

Las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (documento USPN 4.946.778 Ladner *et al.*) se pueden adaptar para producir anticuerpos de cadena sencilla para los productos enzimáticos inmunogénicos de esta invención. Asimismo, se pueden utilizar ratones transgénicos para expresar anticuerpos humanizados para los productos enzimáticos inmunogénicos de esta invención.

Los anticuerpos generados contra la enzima de la presente invención se pueden utilizar en el escrutinio de enzimas similares de otros organismos y muestras. Tales mecanismos de escrutinio son conocidos en la técnica. Los anticuerpos también se pueden emplear como sonda para escrutar genotecas génicas generadas a partir de este u otros organismos para identificar esta actividad o actividades de reacción cruzada.

El aislamiento y la purificación de los polipéptidos producidos en los sistemas descritos antes se pueden llevar a cabo utilizando métodos convencionales, apropiados para el sistema concreto. Por ejemplo, se pueden utilizar la cromatografía preparativa y las separaciones inmunológicas empleando anticuerpos, tales como anticuerpos monoclonales o policlonales.

Como se ha mencionado antes, los antígenos que se pueden utilizar en la producción de anticuerpos específicos de fitasa incluyen polipéptidos de fitasa, p. ej., cualquiera de las fitasas mostradas en los fragmentos polipeptídicos de la Figura 1. El polipéptido o péptido utilizado para inmunizar un animal se puede obtener mediante métodos recombinantes, de síntesis química o de purificación convencionales. Como es bien sabido en la técnica, con el fin de incrementar la inmunogenicidad, se puede conjugar un antígeno con una proteína portadora. Los portadores comúnmente utilizados incluyen hemocianina de lapa ojo de cerradura (KLH), tiroglobulina, albúmina de suero bovino (BSA), y toxoide del tétanos. El péptido acoplado se utiliza después para inmunizar el animal (p. ej., un ratón, una rata, o un conejo). Además de tales portadores, se pueden administrar coadyuvantes bien conocidos con el antígeno para facilitar la inducción de un respuesta inmunitaria fuerte.

Los anticuerpos policlonales y monoclonales específicos de fitasa se pueden purificar, por ejemplo, mediante la unión a, y la elución de, una matriz que contiene un polipéptido de fitasa, p. ej., el polipéptido de fitasa (o uno de sus fragmentos) para el que se originaron los anticuerpos. Los métodos adicionales para la purificación y concentración de anticuerpos son bien conocidos en la técnica y se pueden poner en práctica con los anticuerpos específicos de fitasa de la invención (véase, p. ej., Coligan *et al.*, 1996).

Los anticuerpos anti-idiotipo correspondientes a antígenos específicos de fitasa se pueden producir utilizando métodos convencionales. Estos anticuerpos se originan para anticuerpos específicos de fitasa, y de este modo imitan los epítopos específicos de fitasa.

Los usos adicionales son de fragmentos de los polipéptidos de fitasa que conservan al menos una actividad o epítopo específicos de fitasa. La actividad de la fitasa se puede analizar examinando la catálisis de fitato a inositol y fosfato libres. Tales fragmentos se pueden identificar fácilmente comparando las secuencias de fitasa encontradas en la Figura 1.

En una exemplificación no limitante, se puede utilizar un fragmento de un polipéptido de fitasa que contiene, p. ej., al menos 8-10 aminoácidos como inmunógeno en la producción de anticuerpos específicos de fitasa. El fragmento puede contener, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que está conservada en las fitasas, y estas secuencias de aminoácidos pueden contener aminoácidos que están conservados en fitasas. En otra exemplificación no limitante, los fragmentos de fitasa descritos antes se pueden utilizar en inmunoanálisis, tales como ELISA, para detectar la presencia de anticuerpos específicos de fitasa en las muestras.

Se pueden emplear diversos métodos para elaborar los animales transgénicos de la invención. En general, se pueden emplear tres de tales métodos. En uno de tales métodos, se cosecha un embrión en la fase pronuclear (un "embrión de una célula") de una hembra y se microinyecta el transgén en el embrión, en cuyo caso el transgén será integrado cromosómicamente tanto en las células germinales como en las células somáticas del animal maduro resultante. En otro de tales métodos, se aislan células pluripotenciales embrionarias y el transgén se incorpora a ellas mediante electroporación, transfección plasmídica o microinyección, seguido de reintroducción de las células pluripotenciales en el embrión donde colonizan y contribuyen a la línea germinal. Los métodos para la microinyección de especies de mamíferos se describen en la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.873.191. En otro más de tales métodos, se infectan células embrionarias con un retrovirus que contiene el transgén por medio del cual las células germinales del embrión tienen el transgén cromosómicamente integrado. Cuando los animales que se van a volver transgénicos son aves, debido a que los huevos fertilizados de aves generalmente experimentan una división celular en las primeras veinte horas en el oviducto, la microinyección en el pronúcleo del huevo fertilizado es problemática debido a la inaccesibilidad del pronúcleo. Por lo tanto, de los métodos para elaborar animales transgénicos descritos generalmente antes, la infección por retrovirus es la preferida para las especies de aves, por ejemplo como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.162.215. Si se va a utilizar la micro-inyección con especies de aves, no obstante, se puede utilizar un procedimiento publicado por Love *et al.*, (Biotechnology, 12 Enero 1994) por medio del cual se obtiene el embrión de una gallina sacrificada aproximadamente dos horas y media después de la puesta del huevo puesto antes, se microinyecta el transgén en el citoplasma del disco germinal y se cultiva el embrión en una cáscara anfitriona hasta

ES 2 328 670 T3

su madurez. Cuando los animales que se van a volver transgénicos son del género bovino o porcino, la microinyección puede ser dificultada por la opacidad de los huevos haciendo difícil de ese modo identificar los núcleos mediante microscopía de contraste de interferencia diferencial tradicional. Para superar este problema, se pueden centrifugar primero los huevos para separar los pronúcleos para una mejor visualización.

5 Los "animales no humanos" de la invención son animales bovinos, porcinos, ovinos y aves (p. ej., vaca, cerdo, oveja, pollo). Los animales "transgénicos no humanos" de la invención se producen introduciendo "transgenes" en la línea germinal del animal no humano. Se puede utilizar células diana embrionarias en diversas fases de desarrollo para introducir los transgenes. Se utilizan diferentes métodos dependiendo de la fase de desarrollo de la célula diana embrionaria. El cigoto es la mejor diana para la microinyección. El uso de cigotos como diana para la transferencia genética tiene una ventaja principal ya que en la mayoría de los casos el ADN inyectado se incorporará al gen anfitrión antes de la primera escisión (Brinster *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4438-4442, 1985). Como consecuencia todas las células del animal transgénico no humano llevarán incorporado el transgén. Esto también se reflejará en general en la transmisión eficaz del transgén del fundador a los vástagos puesto que el 50% de las células germinales 10 albergarán el transgén.

15

El término "transgénico" se utiliza para describir un animal que incluye material genético exógeno en todas sus células. Un animal "transgénico" se puede producir mediante cruzamiento de dos animales químéricos que incluyen material genético exógeno en las células utilizadas en la reproducción. El veinticinco por ciento de los vástagos 20 resultantes serán transgénicos es decir, animales que incluyen el material genético exógeno en todas sus células en ambos alelos, el 50% de los animales resultantes incluirá el material genético exógeno en un alelo y el 25% no incluirá material genético exógeno.

En el método de microinyección el transgén es digerido y purificado libre de cualquier ADN vector, p. ej., mediante 25 electroforesis en gel. Se prefiere que el transgén incluya un promotor asociado operativamente que interaccione con las proteínas celulares implicadas en la transcripción, dando como resultado a la larga la expresión constitutiva. Los promotores útiles en este aspecto incluyen aquellos de citomegalovirus (CMV), virus de la leucemia de Moloney (MLV), y herpes virus, así como aquellos de los genes que codifican la metalotioneína, la actina esquelética, la P-enolpiruvato-carboxilasa (PEPCK), la fosfoglicerato (PGK), DHFR, y la timidina quinasa. También se pueden emplear 30 promotores para las largas repeticiones terminales virales (LTR) tales como el Virus del sarcoma de Rous. Cuando los animales que se va a volver transgénicos son aves, los promotores preferidos incluyen aquellos del gen de la β -globina de pollo, el gen de la lisozima de pollo, y el virus de la leucosis aviar. Los constructos útiles en la transfección plasmídica de células pluripotenciales embrionarias emplearán elementos reguladores adicionales bien conocidos en 35 la técnica tales como elementos intensificadores para estimular la transcripción, aceptores de empalme, señales de terminación y poliadenilación, y sitios de unión al ribosoma para permitir la traducción.

También se puede utilizar la infección retroviral para introducir un transgén en un animal no humano, como se ha descrito antes. Se puede cultivar el embrión no humano en desarrollo *in vitro* hasta la fase de blastocisto. Durante 40 este tiempo, los blastómeros pueden ser dianas para la infección retroviral (Jaenisch, R, Proc. Natl. Acad. Sci USA 73: 1260-1264, 1976). La infección eficaz de los blastómeros se obtiene mediante tratamiento enzimático para separar la zona pelúcida (Hogan, *et al.* (1986) en Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). El sistema vector viral utilizado para introducir el transgén es típicamente un retrovirus de replicación defectuosa que porta el transgén (Jahner, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 6927-6931, 1985; Van der Putten, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA 82: 6148-6152, 1985). La transfección se obtiene fácil y eficazmente 45 cultivando los blastómeros sobre una monocapa de células productoras de virus (Van der Putten, *supra*; Stewart, *et al.*, EMBO J. 6: 383-388, 1987). Alternativamente, se puede realizar la infección en una fase más tardía. El virus o las células productoras de virus se pueden inyectar en el blastocele (D. Jahner *et al.*, Nature 298: 623-628, 1982). La mayoría de las fundadoras serán un mosaico para el transgén puesto que la incorporación se produce sólo en un 50 subgrupo de las células que formaban el animal transgénico no humano. Adicionalmente, la fundadora puede contener diversas inserciones retrovirales del transgén en diferentes posiciones del genoma que generalmente se segregarán en el vástagos. Además, también es posible introducir transgenes en la línea germinal, aunque con una baja eficacia, mediante infección retroviral intrauterina del embrión de gestación media (D. Jahner *et al.*, *supra*).

Un tercer tipo de célula diana para la introducción del transgén es la célula pluripotencial embrionaria (ES). Las 55 células ES se obtienen de embriones de pre-implantación cultivados *in vitro* y fusionados con embriones (M. J. Evans *et al.*, Nature 292:154-156, 1981; M. O. Bradley *et al.*, Nature 309:255-258, 1984; Gossler, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA 83:9065-9069, 1986; y Robertson *et al.*, Nature 322:445-448, 1986). Los transgenes pueden ser introducidos eficazmente en las células ES mediante transfección con ADN o mediante transducción mediada por retrovirus. Tales 60 células ES transformadas pueden ser combinadas después de eso con blastocitos de un animal no humano. Las células ES colonizan después el embrión y contribuyen a la línea germinal del animal químérico resultante. (Para una revisión véase Jaenisch, R., Science 240:1468-1474, 1988).

"Transformada" significa una célula en la que (o en uno de cuyos antecesores) se ha introducido, por medio de mecanismos de ácidos nucleicos recombinantes, una molécula de ácido nucleico heterólogo. "Heterólogo" hace 65 referencia a una secuencia de ácido nucleico que se origina a partir de otra especie o se modifica a partir de su forma original o la forma expresada fundamentalmente en la célula.

“Transgén” significa cualquier fragmento de ADN que es insertado mediante un artificio en una célula, y se convierte en parte del genoma del organismo (es decir, se integra establemente o en forma de un elemento extracromosómico estable) que se desarrolla a partir de esa célula. Semejante transgén puede incluir un gen que es parcialmente o completamente heterólogo (es decir, foráneo) con respecto al organismo transgénico, o puede representar un gen

- 5 homólogo con respecto a un gen endógeno del organismo. En esta definición se encuentra incluido un transgén creado proporcionando una secuencia de ARN que es transcrita a ADN y después incorporado al genoma. Los transgenes de la invención incluyen secuencias de ADN que codifican fitasas o polipéptidos que tienen actividad fitasa, e incluyen polinucleótidos, que pueden ser expresados en un animal transgénico no humano. El término “transgénico” según se utiliza en la presente memoria incluye adicionalmente cualquier organismo cuyo genoma ha sido alterado mediante 10 manipulación *in vitro* del embrión temprano o huevo fertilizado o mediante tecnología transgénica para inducir un gen inactivado específico. El término “gen inactivado” según se utiliza en la presente memoria, hace referencia a una interrupción dirigida de un gen *in vivo* con pérdida completa de función que se ha logrado mediante cualquier tecnología transgénica familiar para los expertos en la técnica. En una realización, los animales transgénicos que tienen inactivaciones de genes son aquellos en los que el gen diana se ha vuelto no funcional mediante inserción dirigida 15 al gen que se va a volver no funcional mediante recombinación homóloga. Según se utiliza en la presente memoria, el término “transgénico” incluye cualquier tecnología transgénica familiar para los expertos en la técnica que puede producir un organismo que porta un transgén introducido o uno en el que un gen endógeno se ha vuelto no funcional o “inactivado”.

- 20 El transgén que se va a utilizar es una secuencia de ADN que comprende una secuencia que codifica una fitasa o un polipéptido que tienen actividad fitasa, incluyendo un polinucleótido que tiene una secuencia como la que se muestra en el SEQ ID NO: 1 o una secuencia que codifica un polipéptido que tiene una secuencia como la que se muestra en el SEQ ID NO: 2. Donde las secuencias de ADN apropiadas que codifican proteínas que tienen actividad fitasa pero difieren en la secuencia de ácido nucleico debido a la degeneración del código genético también pueden 25 ser utilizadas en la presente memoria, como pueden ser utilizadas las formas truncadas, las variante alelicas y los homólogos interespecie.

- Después de que el embrión haya sido microinyectado, colonizado con células pluripotenciales embrionarias transfetadas o infectado con un retrovirus que contiene el transgén (excepto para la práctica de la invención sujeto en 30 especies aviares que se trata en otra parte de la presente memoria) el embrión es implantado en el oviducto de una hembra pseudopregnada. La consiguiente progenie se somete a ensayo en cuanto a la incorporación del transgén mediante análisis de transferencia Southern de muestras de sangre o tejido utilizando sondas específicas del transgén. La PCR es particularmente útil en este aspecto. La progenie positiva (G0) se cruza para producir los vástagos (G1) que se analizan en cuanto a la expresión del transgén mediante análisis de transferencia Northern de muestras de tejidos.

- 35 Estos métodos incrementan la absorción de fósforo en el animal transgénico y/o disminuyen la cantidad de contaminante en el estiércol del organismo transgénico aproximadamente un 15%, típicamente aproximadamente un 20%, y más típicamente aproximadamente de un 20% a aproximadamente un 50%.

- 40 Los animales contemplados para su uso en la práctica de la presente invención son aquellos animales generalmente referidos como animales domésticos incluyendo mascotas (p. ej., especies caninas, felinas, aviares etc.) y aquellos útiles para el procesamiento de comestibles, es decir, aves tales como pollos de cría para carne y ponedoras de huevos y pavos, óvidos tales como cordero, bóvidos tales como ganado vacuno y vacas de leche, peces y súidos. Para los fines de la presente invención, estos animales son referidos como “transgénicos” cuando semejante animal tiene una secuencia heteróloga de ADN, o una o más secuencias de ADN adicionales normalmente endógenas para el animal (colectivamente referidas en la presente memoria como “transgenes”) integradas cromosómicamente en las células germinales del animal. El animal transgénico (incluyendo su progenie) también tendrá el transgén integrado fortuitamente en los cromosomas de las células somáticas.

- 50 En algunos casos puede ser ventajoso liberar y expresar una secuencia de fitasa de la invención localmente (por ej., en un tipo de tejido o célula concreto). Por ejemplo, la expresión local de una fitasa o enzima digestiva en el intestino del animal ayudará a la digestión y absorción, por ejemplo, de fitato y fósforo, respectivamente. La secuencia nucleica puede ser liberada directamente en las glándulas, el tejido y las células salivares y/o en las células epiteliales que revisten el intestino, por ejemplo. Tales métodos de liberación son conocidos en la técnica e incluyen electroporación, vectores virales y absorción directa de ADN.

- Por ejemplo, un constructo de ácido nucleico de la presente invención comprenderá moléculas de ácido nucleico en una forma adecuada para la absorción en células diana dentro de un tejido anfitrión. Los ácidos nucleicos pueden estar en forma de moléculas de ADN o ARN desnudo, donde las moléculas pueden comprender uno o más genes estructurales, uno o más genes reguladores, cadenas antisentido, cadenas susceptibles de formación de triplex, o similares. Comúnmente, el constructo de ácido nucleico incluirá al menos un gen estructural bajo el control transcripcional y traduccional de una región reguladora adecuada. Más usualmente, los constructos de ácido nucleico de la presente invención comprenderán ácidos nucleicos incorporados a un vehículo de liberación para mejorar la eficacia de transfección, donde el vehículo de liberación se dispersará en partículas más grandes que comprenden un material excipiente hidrófilo seco.

Uno de tales vehículos de liberación comprende vectores virales, tales como retrovirus, adenovirus, y virus adenoasociados, que han sido inactivados para prevenir la auto-replicación pero que mantienen la capacidad viral nativa de

unirse a una célula anfitriona diana, liberar material genético en el citoplasma de la célula anfitriona diana, y promover la expresión de genes estructurales y otros que han sido incorporados a la partícula. Los retrovirus adecuados para la transferencia génica mediada son descritos por Kahn *et al.* (1992) CIRC. RES. 71: 1508-1517. Una liberación génica de adenovirus adecuada es descrita por Rosenfeld *et al.* (1991) SCIENCE 252: 431-434. Los sistemas de liberación retrovirales y de adenovirus son descritos por Friedman (1989) SCIENCE 244:1275-1281.

Un segundo tipo de vehículo de liberación de ácido nucleico comprende vesículas de transfección liposomales, incluyendo constructos liposomales tanto aniónicos como catiónicos. El uso de liposomas aniónicos requiere que los ácidos nucleicos sean atrapados dentro del liposoma. Los liposomas catiónicos no requieren atrapamiento de ácido nucleico y en lugar de ello se pueden formar mediante simple mezclado de los ácidos nucleicos y los liposomas. Los liposomas catiónicos se unen ávidamente a las moléculas de ácido nucleico cargadas negativamente, incluyendo tanto ADN como ARN, para producir complejos que proporcionan una eficacia de transfección razonable en muchos tipos de células. Véase, Farhood *et al.* (1992) BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA. 1111: 239-246. Un material particularmente preferido para formar vesículas liposomales es la lipofectina que está compuesta por una mezcla equimolar de dioleil-fosfatidiletanolamina (DOPE) y dioleiloxipropil-trietilamonio (DOTMA), como describen Feigner y Ringold (1989) NATURE 337: 387-388.

También es posible combinar estos dos tipos de sistemas de liberación. Por ejemplo, Kahn *et al.* (1992), *supra.*, ilustran que se puede combinar un vector de retrovirus en una vesícula de DEAE-dextrano catiónica para aumentar adicionalmente la eficacia de la transformación. También es posible incorporar proteínas nucleares a vesículas de liberación virales y/o liposomales para mejorar adicionalmente las eficacias de transfección. Véase, Kaneda *et al.* (1989) SCIENCE 243: 375-378.

En otra realización, se proporciona un coadyuvante digestivo que contiene una enzima como único ingrediente activo o combinada con uno o más agentes y/o enzimas distintos (como se describe en la solicitud co-pendiente U.S. Núm. de Serie 09/580.937, titulada "Dietary Aids and Methods of Use Thereof", presentada el 25 de mayo de 2000). El uso de enzimas y otros agentes en ayudas digestivas de ganado o animales domésticos no sólo mejora la salud y la esperanza de vida del animal si no que también ayuda a incrementar la salud del ganado y la producción de productos alimenticios a partir del ganado.

Actualmente, algunos tipos de alimentos para el ganado (p. ej., ciertos alimentos para la volatería) están muy complementados con numerosos minerales (p. ej., fósforo inorgánico), enzimas, factores de crecimiento, fármacos, y otros agentes para el reparto al ganado. Estos suplementos sustituyen muchas de las calorías y nutrientes naturales presentes en los cereales, por ejemplo.

Al reducir o eliminar el suplemento de fósforo inorgánico y otros suplementos (p. ej., sales de minerales vestigiales, factores de crecimiento, enzimas, antibióticos) del propio alimento, el alimento sería susceptible de llevar más nutrientes y energía. Por lo tanto, la dieta restante contendría energía más utilizable. Por ejemplo, las dietas de harina de cereales-aceite de semillas contienen generalmente aproximadamente 3.200 kcal de energía metabolizable por kilogramo de dieta, y las sales minerales no suministran energía metabolizable. La eliminación de los minerales innecesarios y la sustitución por cereal incrementaría por lo tanto la energía utilizable en la dieta. De este modo, la invención puede ser diferenciada del alimento que contiene fitasa comúnmente utilizado. Por ejemplo, en una realización, se utiliza un material biocompatible que es resistente a la digestión por el tracto gastrointestinal de un organismo.

En muchos organismos, incluyendo, por ejemplo, volatería o aves tales como, por ejemplo, pollos, pavos, gansos, patos, loros, pavos reales, avestruces, faisanes, codornices, palomas, emús, kiwis, somormujos, carolinias, cacatúas, canarios, pingüinos, flamencos, y tórtolas turcas, el tracto digestivo incluye una molleja que almacena y utiliza objetos biocompatibles duros (p. ej., rocas y conchas de marisco) para ayudar a la digestión de semillas y otros alimentos consumidos por un ave. Un tracto digestivo típico de esta familia general de organismos, incluye el esófago que contiene una bolsa, denominada buche, donde se almacena el alimento durante un breve período de tiempo. Desde el buche, la comida se mueve hacia abajo al estómago verdadero, o *proventrículo*, donde el ácido clorhídrico y la pepsina comienzan el proceso de la digestión. A continuación, la comida se mueve hacia la molleja, que es de forma oval y con paredes gruesas con potentes músculos. La función principal de la molleja es moler o triturar las partículas de comida - un procedimiento que es ayudado por la ingesta por parte del ave de pequeñas cantidades de grava fina o arenilla. Desde la molleja, la comida se mueve hacia el duodeno. El intestino delgado de las aves es similar al de mamíferos. Existen dos bolsas ciegas o *ceca*, de aproximadamente 10,2-15,2 centímetros de longitud en la unión del intestino delgado y grueso. El intestino grueso es corto, constando principalmente del recto de aproximadamente 7,6-10,2 centímetros de longitud. El recto vacía en la *cloaca* y las heces son excretadas a través del ano.

Los objetos biocompatibles duros consumidos (o introducidos de otro modo) y presentados en la molleja proporcionan un vector útil para el reparto de diversos agentes enzimáticos, químicos, terapéuticos y antibióticos. Estas sustancias duras tienen una vida útil de unas pocas horas a unos pocos días y después de un período de tiempo pasan. Por lo tanto, la invención proporciona coadyuvantes dietéticos modificados impregnados, recubiertos (p. ej., matrices y membranas impregnadas) para la liberación de agentes digestivos o terapéuticos útiles en un organismo. Tales coadyuvantes dietéticos incluyen objetos que son típicamente ingeridos por el organismo para ayudar a la digestión dentro de la molleja (p. ej., rocas o arenilla). La invención proporciona objetos biocompatibles que están recubiertos o impregnados de agentes útiles como coadyuvante digestivo para un organismo o para el reparto de un agente terapéutico o médico o un producto químico.

ES 2 328 670 T3

En una primera realización, la invención proporciona un coadyuvante dietético, que tiene una composición biocompatible diseñada para la liberación de un agente que ayuda a la digestión, donde la composición biocompatible se diseña para consumo oral y liberación en el tracto digestivo (p. ej., la molleja) de un organismo. "Biocompatible" significa que la sustancia, tras el contacto con un organismo anfitrión (p. ej., un ave), no obtiene una respuesta perjudicial suficiente para producir el rechazo de la sustancia o para volver inoperable la sustancia. Semejante inoperancia se puede producir, por ejemplo, mediante formación de una estructura fibrótica alrededor de la sustancia limitando la difusión de los agentes impregnados al organismo anfitrión o una sustancia que da como resultado un aumento de la mortalidad o morbidez en el organismo debido a la toxicidad o a una infección. Una sustancia biocompatible puede ser no biodegradable o biodegradable. En una realización, la composición biocompatible es resistente a la degradación o digestión por el tracto gastrointestinal. En otra realización, la composición biocompatible tiene la consistencia de una roca o una piedra.

Un material no biodegradable útil en la invención es aquel que permite el anclaje o impregnación de un agente dietético. Tales materiales no biodegradable incluyen, por ejemplo, termoplásticos, tales como acrílicos, modacrílicos, poliamidas, policarbonatos, poliésteres, polietilenos, polipropilenos, poliestirenos, polisulfonas, polietersulfonas, y polifluoruro de vinilideno). Los elastómeros también son materiales útiles e incluyen, por ejemplo, poliamidas, poliésteres, polietilenos, polipropilenos, poliestirenos, poliuretanos, polí(alcoholes vinílicos) y siliconas (p. ej., silicona con una base o que contiene sílice). La invención proporciona composiciones biocompatibles que pueden contener una pluralidad de tales materiales, que pueden ser, p. ej., mezclados o dispuestos en capas para formar mezclas, copolímeros o sus combinaciones.

Según se utiliza en la presente memoria, un material "biodegradable" significa que la composición se erosionará o degradará *in vivo* para formar especies químicas más pequeñas. La degradación se puede producir, por ejemplo, mediante procedimientos enzimáticos, químicos o físicos. Los materiales biodegradables adecuados contemplados para su uso en la invención incluyen polilactidas), poliglicolidos), poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicolicos), polianhidridos, poliortoésteres, polieterésteres, policaprolactonas, poliesteramidas, policarbonatos, policianoacrilatos, poliuretanos, poliacrilatos. Tales materiales se pueden mezclar o disponer en capas para formar mezclas, copolímeros o sus mezclas.

Se contempla que se pueden ingerir o suministrar de otro modo numerosas sustancias biocompatibles diferentes al mismo organismo simultáneamente, o en diversas combinaciones (p. ej., un material antes del otro). Además, la sustancia biocompatible puede ser diseñada para que pase lentamente a través del tracto digestivo. Por ejemplo, las sustancias grandes o grasas tienden a moverse más lentamente a través del tracto digestivo, por lo tanto, se puede utilizar un material biocompatible que tenga un gran tamaño para evitar el paso rápido por el tracto digestivo. Tales sustancias grandes pueden ser una combinación de sustancias no biodegradables y biodegradables. Por ejemplo, una sustancia pequeña no biodegradable puede estar abarcada por una sustancia biodegradable de manera que durante un período de tiempo la porción biodegradable se degrada permitiendo que la sustancia no biodegradable pase a través del tracto digestivo. Además, se admite que se puede proporcionar cualquier número de aromatizantes a la sustancia biocompatible para ayudar a su consumo.

Cualquier número de agentes solos o combinados con otros agentes puede recubrir la sustancia biocompatible incluyendo polipéptidos (p. ej., enzimas, anticuerpos, citoquinas o pequeñas moléculas terapéuticas), y antibióticos, por ejemplo. Los ejemplos de los agentes útiles concretos se enumeran en las Tablas 1 y 2, más abajo. También se contempla que las células puedan ser encapsuladas en el material biocompatible de la invención y utilizadas para repartir las enzimas o agentes terapéuticos. Por ejemplo, se pueden diseñar sustancias porosas que tengan poros suficientemente grandes para que las células crezcan en ellos y a través de ellos y para que estos materiales porosos puedan ser absorbidos después en el tracto digestivo. Por ejemplo, la sustancia biocompatible también puede estar compuesta por una pluralidad de entornos para microflora (p. ej., diferente porosidad, pH etc.) que proporcionan soporte para una pluralidad de tipos de células. Las células pueden ser diseñadas genéticamente para liberar un fármaco, enzima o agente químico concreto en el organismo. Las células pueden ser eucarióticas o procarióticas.

55

60

65

ES 2 328 670 T3

TABLA 1

	Clase de Tratamiento	Agente Químico	Descripción
5	Antibióticos	Amoxicilina y Sus Combinaciones	Tratamiento Contra Enfermedades Bacterianas
10		Mastox Inyectable (Amoxicilina y Cloxacilina)	Causadas Por Bacterias Gram+ Y Gram-
15		Ampicilina y Sus Combinaciones	Tratamiento Contra Enfermedades Bacterianas
20		Biolox Inyectable (Ampicilina y Cloxacilina)	Causadas por Bacterias Gram+ Y Gram -
25		Nitrofurazona + Urea	Tratamiento Infecciones Genitales
30		Nefrea Bolo	
35		Trimetoprim +	Tratamiento Del Tracto Respiratorio
40		Sulfametoxazol	Infecciones, Tracto Gastrointestinal
45		Trizol Bolo	Infecciones, Infecciones Urino-Genitales.
50		Metronidazol y Furazolidona	Tratamiento De Bacterianas Y Protozoicas
55		Metofur Bolo	Enfermedades.
60		Ftalilsulfatiazol, Pectina y	Tratamiento De Bacteriana Y No Específica
65			

Clase de Tratamiento	Agente Químico	Descripción
5	Caolin	Diarrea, Disentería Bacilar y Ternera
10	Pectolin	Diarrea.
15	Bolo	
20	Suspensión	
25	Antihelmínticos	Ectoparasiticida
30	Pomada Germex (Hexacloruro de Gamma Benceno,	Ectoparasiticida y Antiséptico
35	Proflavin Hemisulfato y Cetrimida)	
40	Endoparasiticidas Albendazol y Sus Combinaciones	> Prevención Y Tratamiento De Nematodos, Cestodos y Fasciola
45	Alben (Albendazol)	Infestaciones
50	Suspensión (Albendazol al 2,5%)	
55	Suspensión Plus (Albendazol al 5%)	
60	Forte Bolo (Albendazol al 1,5 Gm.)	
	(Albendazol Comprimidos 600 Mg.)	

ES 2 328 670 T3

Clase de Tratamiento	Agente Químico	Descripción
5	Polvo (Albendazol al 5%, 15%)	
10	Alpraz (Albendazol Y	Prevención Y Tratamiento De
15	Praziquantel) Comprimidos	Nematodos y Cestodos Infestación En Cánidos y Félicos.
20	Oxiclozanida y Sus	Prevención y Tratamiento De Fasciola
25	Combinaciones	Infestaciones
30	Clozan (Oxiclozanida) Bolo,	
35	Suspensión	
40	Tetzan (Oxiclozanida y	Prevención y Tratamiento De Nematodos
45	Tetramisol HCl) Bolo,	E Infestaciones por Fasciola
50	Suspensión	
55	Fluzan (Oxiclozanida y	Prevención y Tratamiento De Nematodos
60	Levamisol HCl) Bolo,	Infestaciones E Inmunidad Creciente
65	Suspensión	
	Levamisol	Prevención y Tratamiento De

ES 2 328 670 T3

Clase de Tratamiento	Agente Químico	Descripción
5		Nematodos
10	Nemasol Inyectable	Infestaciones e Inmunidad Creciente.
15	Wormnil Polvo	
20	Fenbendazol	Prevención Y Tratamiento de Infestaciones por Nematodos y Cestodos
25	Fenzol Comprimidos (Fenbendazol 150 Mg.)	
30	Bolo (Fenbendazol 1,5 Gm.)	
35	Polvo (Fenbendazol al 2,5% P/P)	
40	Tónicos	Complejo Vitamina B, Amino
45	Ácidos y Extracto Hepático	Debilidad, Convulsiones Neurálgicas
50	Heptogen Inyectable	Emaciación y Crecimiento Atrofiado.
55	Levulinato de Calcio Con Vit.B ₁₂	Prevención y tratamiento de
60	y Vit D ₃	hipocalcemia, terapia de apoyo en

ES 2 328 670 T3

Clase de Tratamiento	Agente Químico	Descripción
5		enfermedad
10	Hylactin Inyectable	condiciones (especialmente hipotermia) y
15		tratamiento de fases tempranas de raquitismo.
20		
25	Suplementos de Alimentos Animales	Minerales Esenciales, Selenio y Anestro Causante de
30	Vitamina E	Infertilidad y Hembras Repetidoras En Lecheras
35	Gynolactin Bolo	Animales y Caballos.
40	Minerales Esenciales, Vitamina E,	Infertilidad, Lactación Inapropiada, Descenso de
45	y Yodo	Inmunidad, Crecimiento Atrofiado y Debilidad.
50		
55	Hylactin Polvo	
60	Electrolitos Esenciales con	Diarrea, Deshidratación, Antes y después
65	Vitamina C	Transporte, En Extremas

ES 2 328 670 T3

Clase de Tratamiento	Agente Químico	Descripción
5		temperaturas
10	Electra - C Polvo	(Altas o Bajas) y otras Condiciones de
15		estrés.
20	Pyrenox Plus (Diclofenaco)	Tratamiento De Mastitis, Pirexia Post
25	Sódico + Paracetamol) Bolo,	Quirúrgica Dolor e Inflamación, Prolapso
30	Inyectable.	Del Útero, Cojera y Artritis.

TABLA 2

Formulaciones Terapéuticas

Producto	Descripción
Acutrim® (fenilpropanolamina)	Comprimidos supresores del apetito una vez al día.
El Infusor Baxter®	Para liberación intravenosa controlada de anticoagulantes, antibióticos, agentes quimioterapéuticos, y otros fármacos ampliamente utilizados.
Catapres-TTS® (sistema terapéutico transdérmico con clonidina)	Sistema transdérmico una vez a la semana para el tratamiento de la hipertensión.
Covera HS® (verapamil hidrocloruro)	Comprimidos de Liberación de Comienzo Retardado Controlada (COER-24) para el tratamiento

	Producto	Descripción
5		de la hipertensión y angina de pecho.
10	DynaCirc CR® (isradipina)	Comprimidos de liberación prolongada una vez al día para el tratamiento de la hipertensión.
15		
20	Efidac 24® (clorfeniramina maleato)	Comprimidos de liberación prolongada una vez al día para el alivio de los síntomas de la alergia.
25		
30	Estraderm® (sistema transdérmico de estradiol)	Sistema transdérmico dos veces por semana para el tratamiento de ciertos síntomas postmenopáusicos y de prevención de la osteoporosis
35		
40	Glucotrol XL® (glipizida)	Comprimidos de liberación prolongada una vez al día utilizados junto con la dieta para el control de la hiperglicemia en pacientes con diabetes melitus no insulino dependiente.
45		
50	IVOMEC SR® Bolo (ivermectina)	Sistema de liberación ruminal para el control estacional de los principales parásitos internos y externos en el ganado.
55		
60	Minipress XE® (prazosin)	Comprimidos de liberación prolongada una vez al día para el tratamiento de la hipertensión.

Producto	Descripción
5 NicoDerm® CQ® (sistema transdérmico de nicotina)	Sistema transdérmico utilizado como ayuda una vez al día para dejar de fumar para aliviar los síntomas de abstinencia de la nicotina.
10 Procardia XL® (nifedipina)	Comprimidos de liberación prolongada una vez al día para el tratamiento de la angina y la hipertensión.
15 Sudafed® 24 Horas (pseudoefedrina)	Descongestivo nasal una vez al día para aliviar resfriados, sinusitis, fiebre del heno y otras alergias respiratorias.
20 Transderm-Nitro® (sistema transdérmico de nitroglicerina)	Sistema transdérmico una vez al día para la prevención de la angina de pecho debida a enfermedad arterial coronaria.
25 Transderm Scop® (sistema transdérmico de escopolamina)	Sistema transdérmico para la prevención de náuseas y vómitos asociados con el mareo por movimiento.
30 Volmax (albuterol)	Comprimidos de liberación prolongada para aliviar el broncoespasmo en pacientes con enfermedad obstructiva reversible de las vías respiratorias.
35 Actisite®	(tetraciclina hidrocloruro) Fibra periodontal utilizada como accesorio para raspado y alisado radicular para la
40	
45	
50	
55	
60	

ES 2 328 670 T3

Producto	Descripción
5 10 15	reducción de la profundidad de la bolsa y sangrado del sondaje en pacientes con periodontitis adulta.
ALZET®	Bombas osmóticas para investigación en laboratorio.
20 25 30 35	Amphotec® (complejo de anfotericina B con sulfato de colesterol para inyectables) AMPHOTEC® es un tratamiento fungicida para la aspergilosis invasiva en pacientes en los que el deterioro renal o la toxicidad inaceptable excluyen el uso de amfotericina B en dosis eficaces y en pacientes con aspergilosis invasiva en los que la terapia con anfotericina B anterior ha fracasado.
40 45 50	BiCitra® (citrato de sodio y ácido cítrico) Agente alcalinizante utilizado en aquellas condiciones en las que es deseable el mantenimiento a largo plazo de orina alcalina.
55 60	Ditropan® (cloruro de oxibutinina) Para el alivio de los síntomas de inestabilidad de la vejiga asociada con la vejiga neurogénica inhibida o neurogénica refleja (es decir, urgencia, frecuencia, pérdida urinaria, urge-incontinencia, disuria).
	Ditropan® XL (cloruro de oxibutinina) Es un comprimido de liberación controlada una vez al día

Producto	Descripción
5	indicado para el tratamiento de la vejiga hiperactiva con síntomas de urge-incontinencia, urgencia y frecuencia urinaria.
10	
15	DOXIL® (inyección de doxorrubicina HCl liposomal)
20	
25	Duragesic® (sistema transdérmico de fentanilo) CII
30	Sistema transdérmico de 72 horas para gestión de dolor crónico en pacientes que requieren analgesia continua con opiáceos para el dolor que no puede ser gestionado por medios menores tales como combinaciones de acetaminofeno-opiáceos, analgésicos no esteroideos, o dosificación PRN con opiáceos de acción corta.
35	
40	Elmiron® (pentosan polisulfato sódico)
45	Indicado para el alivio del dolor de la vejiga o las molestias asociadas con la cistitis intersticial.
50	
55	ENACT AirWatch®
60	Un sistema de control y gestión del asma.
65	Ethyol® (amifostina)

Indicado para reducir la toxicidad renal cumulativa asociada con la administración repetida de cisplatino en pacientes con cáncer ovárico avanzado o cáncer de pulmón de células no pequeñas. Indicado para reducir la incidencia de

ES 2 328 670 T3

Producto	Descripción
5	la xerostomía de moderada a grave en pacientes que experimentan tratamiento con radiación post-operatoria para cáncer de cabeza y cuello, donde el puerto de radiación incluye una porción sustancial de las glándulas parótidas.
10	
15	
20	Mycelex® Trociscos (clotrimazol) Para el tratamiento local de candidiasis orofaringea. También indicado profilácticamente para reducir la incidencia de candidiasis orofaringea en pacientes inmunocomprometidos por afecciones que incluyen quimioterapia, radioterapia, o terapia con esteroides utilizada en el tratamiento de leucemia, tumores sólidos, o trasplante renal.
25	
30	
35	
40	
45	Neutra-Phos® (fosfato de potasio y sodio) un suplemento dietético/nutricional
50	
55	
60	PolyCitra® -K Solución Oral y PolyCitra® -K Cristales (citrato de potasio y ácido cítrico) Agente alcalinizante útil en aquellas condiciones en las que es deseable el mantenimiento a largo plazo de una orina alcalina, por ejemplo en pacientes con ácido úrico y cálculos de cistina del tracto urinario, especialmente cuando la administración de sales de

Producto	Descripción
5	sodio no es deseable o está contraindicada
10 PolyCitra® -K Jarabe y LC (tricitratos)	Agente alcalinizante útil en aquellas condiciones en las que es deseable el mantenimiento a largo plazo de una orina alcalina, por ejemplo en pacientes con ácido úrico y cálculos de cistina del tracto urinario.
15 Progestasert® (progesterona)	Sistema Contraceptivo de Progesterona Intrauterino
20 Testoderm® Testoderm® con Adhesivo y Testoderm® TTS CIII	Los productos Testosterone Transdermal System The Testoderm® están indicados para la terapia de sustitución en machos para condiciones asociadas con una deficiencia o ausencia de testosterona endógena: (1) Hipogonadismo primario (congénito o adquirido) o (2) Hipogonadismo hipogonadotrópico (congénito o adquirido).
25 30 35 40 45 50 55	Viadur® (implante de acetato de leuprolida) Implante una vez al año para el tratamiento paliativo del cáncer de próstata

Se pueden diseñar ciertos agentes para que se vuelvan activos o inactivos en ciertas condiciones (p. ej., a ciertos pH, en presencia de un agente activador etc.). Además, puede ser ventajoso utilizar pro-enzimas en las composiciones de la invención. Por ejemplo, una pro-enzima puede ser activada por una proteasa (p. ej., una proteasa salivar que está presente en el tracto digestivo o es introducida artificialmente en el tracto digestivo de un organismo). Se contempla que los agentes liberados por las composiciones biocompatibles de la invención pueden ser activados o inactivados mediante la adición de un agente activador que puede ser ingerido, o liberado de otro modo, en el organismo. Otro mecanismo para el control del agente en el tracto digestivo es un agente sensible al medio ambiente que es activado en el compartimento digestivo apropiado. Por ejemplo, un agente puede ser inactivo a un pH bajo pero activo a pH neutro. Por lo tanto, el agente sería inactivo en el intestino pero activo en el tracto gastrointestinal. Alternativamente, el agente se puede volver activo en respuesta a la presencia de un factor específico del microorganismo (p. ej., microorganismos presentes en el intestino).

ES 2 328 670 T3

En resumen, las ventajas potenciales de la presente invención incluyen, por ejemplo, (1) reducción o posible eliminación de la necesidad de suplementos minerales (p. ej., suplementos de fósforo inorgánico), enzimas, o fármacos terapéuticos para animales (incluyendo peces) del alimento o cereal diario incrementando de ese modo la cantidad de calorías y nutrientes presentes en el alimento, y (2) aumento de la salud y el crecimiento de los animales domésticos y no domésticos incluyendo, por ejemplo, volatería, animales del género porcino, bovino, equino, canino, y felino.

Se puede utilizar un gran número de enzimas adicionales en los métodos y composiciones de la presente invención. Estas enzimas incluyen enzimas necesarias para la digestión apropiada de alimentos consumidos, o para el metabolismo apropiado, la activación o derivación de agentes químicos, profármacos u otros agentes o compuestos liberados en el animal a través del tracto digestivo.

Los ejemplos de las enzimas que se pueden liberar en o incorporar a las composiciones de la invención incluyen, por ejemplo, enzimas potenciadoras del alimento seleccionadas del grupo que consiste en α -galactosidas, β -galactosidas, en particular lactosas, fitasas, β -glucanasas, en particular endo-1,3- β -glucanasas y endo- β -1,3(4)-glucanasas, celulasas, xilosidasas, galactanasas, en particular arabinogalactan-endo-1,4- β -galactosidasas y arabinogalactan-endo-1,3- β -galactosidasas, endoglucanasas, en particular endo-1,2- β -glucanase, endo-1,3- α -glucanasa, y endo-1,3- β -glucanasa, enzimas degradantes de pectina, en particular pectinasas, pectinaesterasas, pectinaliasas, poligalacturonasas, arabinanasas, ramnogalacturonasas, ramnogalacturonan-acetilesterasas, ramnogalacturonan- α -ramnosidasas pectatoliasas, y α -galacturonisidasas, mananasas, β -manosidasas, mananacetilesterasas, xilanacetilesterasas, proteasas, xilanasa, arabinoxilanases y enzimas lipolíticas tales como lipasas, fosfolipasas y cutinasas. Se prefieren las fitasas que se muestran en los SEQ ID NO: 1 y 2 y en la siguiente Tabla 3. Las secuencias descritas en la Tabla 3 son el SEQ ID NO: 1 y 2 que tienen las sustituciones de aminoácidos y sustituciones de nucleótidos descritas en ellos.

25

(Tabla pasa a página siguiente)

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 328 670 T3

TABLA 3

	Denominación	Fuente	Sec AA	Secuencia Nuc.
5	E. coli B (referencia)	E. coli B	S10; P26; D176; M298;A299;G317,I428	
10	868PH1	E. coli de bisón	I428T	
15	872PH1	E. coli de rata canguro	D176G; G312S M298K; A299T	GAC(176)GGC; GGT(312)AGT; ATG(298)AAG; GCA(299)ACA
20	875PH2	E. coli W	A160S; D176G; M298K; A299T	GCG(160)TCG; GAC(176)GGC;
25			M298K; A299T	ATG(298)AAG; GCA(299)ACA
30	873PH1	E. coli de ternera	I428R	
35	E. coli B	E. coli B	K298M; T299A	AAG(298)ATG; ACA(299)GCA
40				
45	K12 appA	E. coli K12	M298K;A299T	ATG(298)AAG; GCA(299)ACA
50				

55 Las enzimas utilizadas en la invención se pueden modificar para potenciar su actividad, liberación, activación y degradación. Tales modificaciones se pueden realizar *in vivo* o *in vitro* y utilizar métodos y procedimientos generalmente conocidos en la técnica como se describe más completamente más abajo. Semejante metodología utiliza generalmente secuencias de polinucleótidos o polipéptidos que son sintetizadas por máquinas automáticas o son clonadas, expresadas, o manipuladas mediante técnicas de recombinación de ADN.

60 En una realización preferida, la enzima utilizada en las composiciones (p. ej., un coadyuvante de la dieta) de la presente invención es una enzima fitasa que es estable al calor y resistente al calor y cataliza la hidrólisis enzimática de fitato, *es decir*, la enzima es capaz de renaturalizarse y recuperar la actividad después de un período de tiempo breve (*es decir*, 5 a 30 segundos), o más largo, por ejemplo, minutos u horas, de exposición a temperaturas por encima de 50°C.

ES 2 328 670 T3

Un “alimento” y una “comida”, respectivamente, significan cualquier dieta natural o artificial, harina o similares o componentes de tales harinas destinadas a o adecuadas para ser ingeridas, absorbidas, digeridas, por un animal y un ser humano, respectivamente. “Coadyuvante de la Dieta”, según se utiliza en la presente memoria, indica, por ejemplo, una composición que contiene agentes que proporcionan un agente terapéutico o digestivo a un animal u organismo.

- 5 Un “coadyuvante de la dieta”, no es típicamente una fuente de ingesta calórica para un organismo, en otras palabras, un coadyuvante dietético no es típicamente una fuente de energía para el organismo, más bien es una composición que es tomada además del “alimento” o la “comida” típicos.

10 Un agente o enzima (p. ej., una fitasa) puede ejercer su efecto *in vitro* o *in vivo*, *es decir* antes de la ingestión o en el estómago o la molleja del organismo, respectivamente. También es posible una acción combinada.

15 Aunque se puede incorporar cualquier enzima al coadyuvante dietético, en la presente memoria se hace referencia a la fitasa como ilustración de los métodos y composiciones de la invención. Un coadyuvante dietético de la invención incluye una enzima. Generalmente, un coadyuvante dietético que contiene una composición de fitasa es líquido o seco.

20 No es necesario que las composiciones líquidas contengan nada más que la enzima preferiblemente en una forma altamente purificada. Normalmente, no obstante, también se añade un estabilizador tal como glicerol, sorbitol o monopropilenglicol. La composición líquida también puede comprender otros aditivos, tales como sales, azúcares, conservantes, agentes para ajustar el pH, proteínas, fitato (un sustrato de fitasa). Las composiciones líquidas típicas son suspensiones acuosas o con una base oleosa. Las composiciones líquidas se pueden añadir a una composición biocompatible para la liberación lenta. Preferiblemente la enzima se añade a una composición coadyuvante de la dieta que es un material biocompatible (p. ej., biodegradable o no biodegradable) e incluye la adición de células recombinantes, por ejemplo, en microcuentas porosas.

25 25 Las composiciones secas pueden ser composiciones secadas por pulverización, en cuyo caso no es necesario que la composición contenga nada más que la enzima en forma seca. Normalmente, no obstante, las composiciones secas son denominadas granulados que pueden ser mezclados fácilmente con componentes de la comida o el alimento, o más preferiblemente, forman un componente de una pre-mezcla. El tamaño de partícula de los granulados de enzima es preferiblemente compatible con el de los otros componentes de la mezcla. Esto proporciona un medio seguro y conveniente de incorporar enzimas al alimento para animales. Preferiblemente los granulados son biocompatibles y más preferiblemente los granulados biocompatibles son no biodegradables.

30 Se pueden preparar granulados por aglomeración recubiertos con una enzima utilizando técnicas de aglomeración en una mezcladora de alta cizalla. Los granulados por absorción se preparan absorbiendo/recubriendo núcleos de un material portador con la enzima. Preferiblemente el material portador es un material biocompatible no biodegradable que simula el papel de piedras o arenilla en la molleja de un animal. Los materiales de carga típicos utilizados en las técnicas de aglomeración incluyen sales, tales como sulfato disódico. Otras cargas son caolín, talco, silicato de magnesio y aluminio y fibras de celulosa. Opcionalmente, también se incluyen cargas tales como dextrinas en los granulados por aglomeración. Los materiales portadores pueden ser cualquier material biocompatible incluyendo materiales biodegradables y no biodegradables (p. ej., rocas, piedras, cerámicas, diversos polímeros). Opcionalmente, los granulados se recubren con una mezcla de recubrimiento. Semejante mezcla comprende agentes de recubrimiento, preferiblemente agentes de recubrimiento hidrófobos, tales como aceite de palma hidrogenado y sebo de vacuno, y si se desea otros aditivos, tales como carbonato de calcio o caolín.

35 45 Adicionalmente, las composiciones coadyuvantes de la dieta pueden contener otros sustituyentes tales como agentes colorantes, compuestos aromatizantes, estabilizadores, vitaminas, minerales, otras enzimas potenciadoras del alimento o la comida etc. Un aditivo típico comprende normalmente uno o más compuestos tales como vitaminas, minerales o enzimas potenciadoras del alimento, enzimas y/o excipientes adecuados.

50 55 En una realización, las composiciones coadyuvantes de la dieta de la invención comprenden adicionalmente una cantidad eficaz de una o más enzimas potenciadoras del alimento, en particular enzimas potenciadoras del alimento seleccionadas del grupo que consiste en α -galactosidasas, β -galactosidasas, en particular lactasas, otras fitasas, β -glucanasas, en particular endo- β -1,4-glucanasas y endo- β -1,3(4)-glucanasas, celulasas, xilosidasas, galactanasas, en particular arabinogalactano-endo-1,4- β -galactosidasas y arabinogalactano-endo-1,3- β -galactosidasas, endoglucanasas, en particular endo-1,2- β -glucanasa, endo-1,3- α -glucanasa, y endo-1,3- β -glucanasa, enzimas degradantes de pectina, en particular pectinasas, pectinosterasas, pectinaliasas, poligalacturonasas, arabinanasas, ramnogalacturonasas, ramnogalacturonano-acetilesterasas, ramnogalacturonano- α -ramnosidasas, pectatoliasas, y α -galacturonisidasas, mananasas, β -manosidasas, mananoacetilesterasas, xilanoacetil-esterasas, proteasas, xilanasa, arabinoxilananasas y enzimas lipolíticas tales como lipasas, fosfolipasas y cutinasas.

60 65 El coadyuvante de la dieta animal de la invención es un suplemento para el animal monogástrico antes o simultáneamente a la dieta. El coadyuvante de la dieta de la invención puede ser administrado como suplemento al animal monogástrico simultáneamente a la dieta. Alternativamente, el coadyuvante de la dieta se añade a la dieta en forma de granulado o líquido estabilizado.

Una cantidad eficaz de una enzima en un coadyuvante de la dieta de la invención es de aproximadamente 10-20.000; preferiblemente de aproximadamente 10 a 15.000, más preferiblemente de aproximadamente 10 a 10.000,

ES 2 328 670 T3

en particular de aproximadamente 100 a 5.000, especialmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 2.000 FYT/kg de coadyuvante de la dieta.

Son ejemplos de otros usos específicos de la fitasa de la invención el procesamiento de soja y la fabricación de inositol o sus derivados.

En un método para reducir los niveles de fitato en estiércol animal, en el que el animal es alimentado con coadyuvante de la dieta que contiene una cantidad eficaz de la fitasa de la invención. Como se ha establecido al principio de la presente solicitud, un efecto importante de la misma consiste en la reducción de la contaminación por fosfato del medio ambiente.

En otra realización, el coadyuvante de la dieta es un portador magnético. Por ejemplo, un portador magnético que contiene una enzima distribuida en, sobre o a través de un portador magnético (por ej., una cuenta magnética porosa), puede ser distribuido sobre un área con elevado contenido de fitato y recogido por medio de imanes después de un período de tiempo. Semejante distribución y recolección de las cuentas reduce la contaminación adicional y permite reutilizar las cuentas. Además, el uso de tales cuentas magnéticas *in vivo* permite la localización del coadyuvante de la dieta en un punto del tracto digestivo donde, por ejemplo, se puede llevar a cabo la actividad fitasa. Por ejemplo, un coadyuvante de la dieta de la invención que contiene enzimas digestivas se puede localizar en la molleja del animal mediante yuxtaposición de un imán cerca de la molleja del animal después de que el animal consuma un coadyuvante de la dieta de portadores magnéticos. El imán se puede separar después de un período de tiempo permitiendo que el coadyuvante de la dieta pase a través del tracto digestivo. Además, los portadores magnéticos son adecuados para su eliminación del organismo después del sacrificio o para ayudar a su recogida.

Cuando el coadyuvante de la dieta es una partícula porosa, tales partículas son impregnadas típicamente con una sustancia con la que se desea liberar lentamente para formar una partícula de liberación lenta. Tales partículas de liberación lenta se pueden preparar no sólo impregnando las partículas porosas con la sustancia que se dese liberar, si no también disolviendo primero la sustancia deseada en la primera fase de dispersión. En este caso, las partículas de liberación lenta preparadas mediante el método en el que la sustancia que se va a liberar se disuelve primero en la primera fase de dispersión también están dentro del alcance de la invención. Las partículas huecas porosas, por ejemplo, pueden ser impregnadas con una sustancia de liberación lenta tal como un medicamento, un agente químico agrícola o una enzima. En particular, cuando se elaboran partículas huecas porosas impregnadas con una enzima a partir de polímeros biodegradables, las propias partículas se pueden utilizar como agente químico o fertilizante, y no tienen efecto adverso sobre el medio ambiente. En una realización las partículas porosas son de naturaleza magnética.

Las partículas huecas porosas se pueden utilizar como soporte biorreactor, en particular un soporte enzimático. Por lo tanto, resulta ventajoso preparar el coadyuvante de la dieta utilizando un método para la liberación lenta, por ejemplo encapsulando la enzima del agente en una microvesícula, tal como un liposoma, de la cual se libera la dosis en el transcurso de varios días, preferiblemente entre aproximadamente 3 y 20 días. Alternativamente, el agente (p. ej., una enzima) se puede formular para la liberación lenta, por ejemplo por incorporación en un polímero de liberación lenta del cual se libera lentamente la dosificación de agente (p. ej., enzima) en el transcurso de varios días, por ejemplo de 2 a 30 días y puede prolongarse toda la vida del animal.

Como es sabido en la técnica, los liposomas derivan generalmente de fosfolípidos u otras sustancias lipídicas. Los liposomas están formados por cristales líquidos hidratados mono- o multilamelares que se dispersan en un medio acuoso. Se puede utilizar cualquier lípido metabolizable, fisiológicamente aceptable, no tóxico capaz de formar liposomas. Las presentes composiciones en forma de liposoma pueden contener estabilizadores, conservantes, excipientes, y similares además del agente. Los lípidos preferidos son los fosfolípidos y las fosfatidicolinas (*lecitinas*), tanto naturales como sintéticos. Los métodos para formar liposomas son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Prescott, Ed., *Methods in Cell Biology*, Volumen XIV, Academic Press, Nueva York, N.Y. (1976), págs. 33 y siguientes.

También está dentro del alcance de la invención el uso de una fitasa de la invención durante la preparación de comida, preparaciones alimenticias o aditivos, *es decir*, la fitasa ejerce su actividad fitasa durante la fabricación sólo y no es activa en la comida o producto alimenticio final. Este aspecto es relevante por ejemplo en la elaboración y cocción de masa. Por lo tanto, se puede impregnar fitasa o levadura recombinante que expresa fitasa en, sobre o a través de portadores magnéticos, distribuirlos en la masa o medio comestible, y recuperarlos mediante imanes.

El coadyuvante de la dieta de la invención se puede administrar sólo a animales en un portador biocompatible (p. ej., biodegradable o no biodegradable) o combinado con otros agentes aditivos para la digestión. El coadyuvante de la dieta de la invención se puede administrar fácilmente como un aderezo final o mezclándolo directamente en el alimento para animales o proporcionarlo separado del alimento, mediante dosificación oral separada, mediante inyección o mediante medios transdérmicos o combinado con otros compuestos comestibles relacionados con el crecimiento, dependiendo de las proporciones de cada uno de los compuestos del organismo o problema concreto que esté siendo tratado y del grado de la respuesta deseada. Se debe entender que la dosificación de la dieta específica en cualquier caso dado se ajustará de acuerdo con los compuestos específicos que se estén administrando, del problema a tratar, de las condiciones del sujeto y de otros hechos relevantes que pueden modificar la actividad del ingrediente eficaz o de la respuesta del sujeto, como es bien sabido por los expertos en la técnica. En general, se pueden emplear una sola dosis al día o dosificaciones diarias divididas, como es bien sabido en la técnica.

ES 2 328 670 T3

Si se administran separadamente del alimento del animal, se pueden preparar formas del coadyuvante de la dieta combinándolas con portadores comestibles farmacéuticamente aceptables no tóxicos para elaborar formulaciones de liberación inmediata o de liberación lenta, como es bien sabido en la técnica. Tales portadores comestibles pueden ser sólidos o líquidos tales como, por ejemplo, almidón de maíz, lactosa, sacarosa, escamas de soja, aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo y propilenglicol. Si se utiliza un portador sólido la forma de dosificación de los compuestos puede ser en comprimidos, cápsulas, polvos, trociscos o grageas o aderezos finales en formas micro-dispersables. Si se utiliza un portador líquido, las formas de dosificación pueden ser cápsulas de gelatina blandas, o jarabe o suspensiones, emulsiones o soluciones líquidas. Las formas de dosificación también pueden contener coadyuvantes, tales como agentes conservantes, estabilizadores, humectantes o emulsionantes, promotores de la solución, etc. También pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas.

De este modo, las ventajas significativas de la invención incluyen por ejemplo, 1) facilidad de fabricación de las composiciones biocompatibles cargadas con el ingrediente activo; 2) versatilidad en lo que se refiere a la clase de polímeros y/o ingredientes activos que se pueden utilizar; 3) rendimientos y eficacias de carga superiores; y 4) la provisión de formulaciones de liberación sostenida que liberan agentes activos intactos, activos *in vivo*, proporcionando de ese modo la liberación controlada de un agente activo a lo largo de un período de tiempo prolongado. Además, otra ventaja se debe a la liberación local del agente en el tracto digestivo (p. ej., la molleja) del organismo. Según se utiliza en la presente memoria la frase "contenido en" indica un método para formular un agente en una composición útil para la liberación controlada, a lo largo de un período de tiempo prolongado del agente.

En las composiciones de liberación lenta o de liberación sostenida de la invención, se utilizará una cantidad eficaz de un agente (p. ej., una enzima o antibiótico). Según se utiliza en la presente memoria, liberación sostenida o liberación lenta hace referencia a la liberación gradual de un agente de un material biocompatible, a lo largo de un período de tiempo prolongado. La liberación sostenida puede ser continua o discontinua, lineal o no lineal, y se puede completar utilizando una o más composiciones biodegradables o no biodegradables, cargas de fármaco, selección de excipientes, u otras modificaciones. Sin embargo, se debe reconocer que puede ser deseable proporcionar una composición de liberación "rápida", que proporcione una liberación rápida una vez consumida por el organismo. También se debe entender que "liberación" no significa necesariamente que el agente sea liberado del portador biocompatible. Más bien en una realización, la liberación lenta abarca la activación lenta o la activación continua de un agente presente en la composición biocompatible. Por ejemplo, una fitasa no necesita ser liberada de la composición biocompatible para ser eficaz. En esta realización, la fitasa está inmovilizada sobre la composición biocompatible.

El alimento para animales puede ser cualquier harina orgánica que contenga proteínas normalmente empleada para satisfacer los requerimientos dietéticos de los animales. Muchas de tales harinas que contienen proteínas están compuestas principalmente por maíz, harina de soja o una mezcla de maíz y harina de soja. Por ejemplo, los productos disponibles en el mercado típicos proporcionados como alimento a las aves incluyen Egg Maker Complete, un alimento para la volatería de Land O'Lakes AG Services, así como Country Game & Turkey Grower un producto de Agwa, Inc. (véase también The Emu Farmer's Handbook de Phillip Minnaar y Maria Minnaar). Ambos productos disponibles en el mercado son ejemplos típicos de alimentos para animales a los que se pueden incorporar el coadyuvante de la dieta y/o la enzima fitasa de la presente invención para reducir o eliminar la cantidad de ingesta de fósforo, zinc, manganeso y hierro suplementaria de tales composiciones.

La presente invención es aplicable a la dieta de numerosos animales, que en la presente memoria se definen por incluir mamíferos (incluyendo seres humanos), aves y peces. En particular, la dieta se puede emplear con mamíferos comercialmente significativos tales como cerdos, ganado vacuno, ovejas, cabras, roedores de laboratorio (ratas, ratones, hámsteres y gerbos), animales de peletería tales como visón y zorro, y animales de zoológico tales como monos y simios, así animales domésticos tales como gatos y perros. Las especies de aves comercialmente significativas incluyen pollos, pavos, patos, gansos, faisanes, emúes, avestruces, somormujos, kiwis, tórtolas turcas, loros, carolinas, cacatúas, canarios, pingüinos, flamencos, y codornices. Los peces criados en granjas comercialmente tales como las truchas también se beneficiarían de los coadyuvantes de la dieta descritos en la presente memoria. Otros peces que se pueden beneficiar incluyen, por ejemplo, peces (especialmente en un acuario o un entorno de acuicultura, p. ej., peces tropicales), carpa dorada y otras carpas ornamentales, pez gato, trucha, salmón, tiburón, raya, platija, lenguado, tilapia, medaka, gupi, moli, plati, cola de espada, pez cebra, y botia.

A menos que se establezca de otro modo, la transformación se realizó como se describe en el método de Sambrook, Fritsch y Maniatis, 1989. Se pretende que los siguientes ejemplos ilustren, pero no limiten, la invención. Si bien los procedimientos descritos en los ejemplos son típicos de aquellos que se pueden utilizar para llevar a cabo ciertos aspectos de la invención, también se pueden utilizar otros procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

60

65

ES 2 328 670 T3

Ejemplo 1

Aislamiento, expresión bacteriana, y purificación de fitasa

5 Se obtuvo ADN de *E.coli* B de Sigma (Núm. de Catálogo D-2001), St. Louis, Nueva Jersey.

Se utilizaron los siguientes cebadores para amplificar mediante PCR el gen directamente a partir del ADN genómico:

10 cebador 5' gtttctgaattcaaggaggaatttaaATGAAAGCGATCTTAATCCCAT (SEQ ID NO: 3); y
cebador 3' gtttctggatccTTACAAACTGCACGCCGGTAT (SEQ ID NO: 4).

15 La reacción de amplificación mediante PCR con polimerasa Pfu se realizó de acuerdo con el protocolo de los fabricantes (Stratagene Cloning Systems, Inc., La Jolla, CA).

20 El producto de la PCR se purificó y el producto purificado y el vector pQE60 (Qiagen) se digirieron ambos con las endonucleasas de restricción EcoRI y BglIII (New England Biolabs) de acuerdo con los protocolos del fabricante. Se realizaron ligaciones durante la noche utilizando protocolos convencionales para producir pQE60.

25 Las secuencias amplificadas se insertaron en marco con la secuencia que codifica RBS. La mezcla de ligación se utilizó después para transformar la cepa de *E. coli* M15/pREP4 (Qiagen, Inc.) mediante electroporación. M15/pREP4 contiene múltiples copias del plásmido pREP4, que expresa el represor lacI y también confiere resistencia a la kanamicina (Kan^r). El ADN plasmídico se aisló y se confirmó mediante análisis de restricción. Los clones que contenían los constructos deseados se hicieron crecer durante la noche (O/N) en cultivo líquido en medio LB con un suplemento de Amp (100 µg/ml) y Kan (25 µg/ml). El cultivo O/N se utilizó para inocular un gran cultivo a una razón de 1:100 a 1:250. Las células se hicieron crecer a una densidad óptica a 600 (D.O.⁶⁰⁰) de entre 0,4 y 0,6. Después se añadió IPTG ("Isopropil-B-D-tiogalacto-piranósido") a una concentración final de 1 mM. El IPTG induce, inactivando el represor lacI, el aclaramiento de P/O conduciendo a un incremento de la expresión génica. Las células se hicieron crecer 3 a 4 horas más. Despues las células se recogieron por centrifugación.

35 Las secuencias de los cebadores mostradas antes también se pueden emplear para aislar el gen diana del material depositado mediante las técnicas de hibridación descritas antes.

40 Son posibles numerosas modificaciones y variaciones de la presente invención a la luz de las enseñanzas anteriores, por lo tanto, dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, la invención se puede poner en práctica de otro modo distinto al descrito concretamente. Se debe entender que, si bien la invención ha sido descrita con referencia a la descripción detallada anterior, se pretende que la descripción precedente ilustre, pero no limite, el alcance de la invención. Otros aspectos, ventajas, y modificaciones de la invención están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

45 Se pueden utilizar las moléculas de fitasa (ácidos nucleicos y enzimas fitasa codificados por los mismos) de todas las demás cepas de *E. coli* (ya sean virulentas o no virulentas, incluyendo K12, W, C), así como de todas las bacterias. Estas incluyen todas las especies y cepas conocidas pertenecientes a:

- Termotogales
- Bacterias Verdes No Sulfurosas
- 50 Cianobacterias y cloroplastos
- Bacterias Gram-positivas con bajo contenido de G+C
- Fusobacterias
- 55 Bacterias Gram-positivas con alto contenido de G+C
- Grupo Gytophaga/Flexibacter/Bacteroides
- 60 Fibrobacterias
- Espiroquetas
- 65 Grupo Planctomyces/Chlamydia

ES 2 328 670 T3

Bacteria Púrpura (Proteobacteria), incluyendo las siguientes subdivisiones:

Delta & Epsilon, incluyendo:

5 *Desulfuromonas acetoxidans*

Desulfosarcina variabilis

10 *Bdellovibrio stolpii*

Nannocystis exedens

Stigmatella aurantiaca

15 *Myxococcus xanthus*

Desulfovibrio desulfuricans

Thiovulum sp.

20 *Campylobacter jejuni*

Wolinella succinogenes

25 *Helicobacter pylori*

Alpha, incluyendo:

30 *Methylobacterium extorquens*

Beijerinckia indica

Hypomicrobium vulgare

35 *Rhodomicrobium vannielii*

Agrobacterium tumefaciens

40 *Brucella abortus*

Rochalimaea quintana

Rhodopseudomonas marina subsp. agilis

45 *Zea mays - mitocondria*

Rickettsia rickettsii

50 *Ehrlichia risticii*

Wolbachia pipiensis

Anaplasma marginale

55 *Erythrobacter longus*

Rhodospirillum salexigens

60 *Rhodobacter capsulatus*

Azospirillum lipoferum

Rhodospirillum rubrum

65

ES 2 328 670 T3

Gamma, incluyendo:

Ectothiorhodospira shaposhnikovii

5 *Chromatium vinosum*

Methylomonas metanica

10 *Cardiobacterium hominis*

10 *Xanthomonas maltophilia*

Coxiella burnetii

15 *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila*

Oceanospirillum linum

20 *Acinetobacter calcoaceticus*

20 *Pseudomonas aeruginosa*

Haemophilus influenzae

25 *Vibrio parahaemolyticus*

Proteus vulgaris

30 *Erwinia carotovora*

Escherichia coli, incluyendo:

Beta, incluyendo:

35 *Eikenella corrodens*

Neisseria gonorrhoeae

40 *Vitreoscilla stercoraria*

Chromobacterium violaceum

45 *Alcaligenes faecalis*

45 *Rubrivivax gelatinosus*

Pseudomonas testosteroni

50 *Nitrosomonas europaea*

Spirillum volutans

55 Semejantes moléculas de fitasa se pueden aislar de estas bacterias mediante métodos conocidos, incluyendo métodos de escrutinio de genotecas, p. ej. escrutinio de la expresión, métodos de hibridación, PCR (p. ej. véase Sammbrook, 1989).

60 Ejemplo 1

60 Análisis de tolerancia térmica

El appA de tipo salvaje de *E. coli* (cepa K12) y una versión mutagenizada denominada 819PH59 (SEQ ID NO: 9 y 10) fueron expresados en *E. coli* y purificados hasta la homogeneidad. En el análisis de tolerancia térmica, se calentaron 100 µL de proteína de 0,01 mg/mL en MOPS 100 mM/pH 7,0 a la temperatura de incubación indicada durante 5 minutos en un termociclador Research RJ. Una vez completados los 5 minutos a esa temperatura, se enfriaron las muestras a 4°C y se incubaron sobre hielo. Se realizó un análisis de la actividad utilizando 40 µL de la solución de enzima en 1,5 mL de NaOAc 100 mM/fitato 4 mM/pH 4,5 a 37°C. Se retiraron alícuotas de 60 µL a intervalos de

ES 2 328 670 T3

2 minutos y se añadieron a 60 μ L del revelador de color/solución de parada del análisis TNO. Claramente, la enzima modificada, SEQ ID NO: 10, que contiene 8 cambios de aminoácidos, es tolerante a temperaturas mayores que la enzima de tipo salvaje. (Véase la Figura 3).

5

Ejemplo 2

Estabilidad de la enzima fitasa en condiciones de digestibilidad simulada

10 Se trazaron el porcentaje de actividades residuales (basándose en las tasas iniciales) de la fitasa de *E. coli* K12 digerida *in vitro* y la 819pH59 no glicosilada versus tiempo. Se preparó una concentración normalizada de fluido gástrico simulado que contenía 2 mg/ml de NaCl, HCl 6 M y 3,2 mg/mL de pepsina como se describe. El pH de la solución fue de aproximadamente 1,4 y no se ajustó. El análisis de digestibilidad *in vitro* se realizó añadiendo fitasa a la solución de digestión 1:4 (vol:vol) e incubando inmediatamente a 37°C para iniciar la reacción de digestión. Las
15 alícuotas de la mezcla de reacción de digestión se separaron a diversos intervalos de tiempo y se analizaron en cuanto a la actividad fitasa residual utilizando el análisis TNO. Cada uno de los análisis se realizó al menos dos veces. Una curva exponencial con la ecuación $y = Ae^{-kt}$ se ajustó a los datos. Las vidas medias de las proteínas se determinaron utilizando la ecuación $t_{1/2} = \ln 2/k$. La vida media de la fitasa de *E. coli* K12 fue sólo $2,7 \pm 0,2$ minutos mientras la fitasa no glicosilada 819pH59 tuvo una vida media de $8,4 \pm 1,1$ minutos. Por lo tanto, las mutaciones en la fitasa de
20 *E. coli* K12 de tipo salvaje aumentaron la estabilidad de la enzima en condiciones de digestibilidad *in vitro* simuladas. Véase la Figura 4.

10

Ejemplo 3

25

Comparaciones en anfitriones de expresión

Se insertó el constructo de ADN GSSM de 819PH59 en *E. coli*, *P. pastoris*, y *S. pombe* para su expresión. Las proteínas expresadas se purificaron hasta la homogeneidad. En el análisis de tolerancia térmica, se calentaron 100 μ L de 0,01 mg/mL de proteína en MOPS 100 mM, pH 7,0 a la temperatura de incubación indicada durante 5 minutos en un termociclador Research RJ. Una vez completados los 5 minutos a esa temperatura, las muestras se enfriaron a 4°C y se incubaron sobre hielo. Se realizó un análisis de la actividad utilizando 40 μ L de la solución de enzima en 1,46 mM de NaOAc 100 mM/fitato 4 mM/pH 4,5 a 37°C. Se retiraron alícuotas de 60 μ L a intervalos de 2 minutos y se añadieron a 60 μ L de revelador de color/solución de parada del análisis TNO. (Véase la Figura 5).

30

35

Ejemplo 4

40 Se trazaron los porcentajes de las actividades residuales (basándose en las tasas iniciales) de la fitasa 819pH59 digerida *in vitro* expresada en diversos anfitriones de expresión versus tiempo. La fitasa de 819pH59 se expresó en *E. coli* (no glicosilada), así como en *S. pombe* y *P. pastoris* (glicosilada). Se preparó una concentración normalizada de fluido gástrico simulado que contenía 2 mg/ml de NaCl, HCl 6 M y 3,2 mg/mL de pepsina como se describe en el S.O.P. El pH de la solución fue de aproximadamente 1,4 y no se ajustó. El análisis de digestibilidad *in vitro* se realizó añadiendo fitasa a la solución de digestión 1:4 (vol:vol) e incubando inmediatamente a 37°C para iniciar la reacción de digestión. Las alícuotas de la mezcla de reacción de digestión se separaron a diversos intervalos de tiempo y se analizaron en cuanto a la actividad residual de fitasa utilizando el análisis TNO. Cada uno de los análisis se realizó por triplicado. Una curva exponencial con la ecuación $y = Ae^{-kt}$ se ajustó a los datos. Las vidas medias de las proteínas se determinaron utilizando la ecuación $t_{1/2} = \ln 2/k$. La vida media de la fitasa 819pH59 no glicosilada expresada en *E. coli* fue de $8,4 \pm 1,1$ minutos mientras la fitasa 819pH59 glicosilada expresada en *S. pombe* tuvo una vida media de
45 $10,4 \pm 0,9$ minutos y la misma fitasa expresada en *P. pastoris* tuvo una vida media de $29,2 \pm 6,7$ mins. Por lo tanto, la glicosilación de la fitasa 819pH59 aumentó la estabilidad de la enzima en condiciones de digestibilidad *in vitro* simulada. (Véase la Figura 6).

45

50

55 Publicaciones citadas

- Association of Official Analytical Chemists: Official Methods of Analysis. *Association of Official Analytical Chemists*, Washington, DC., 1970.
- Ausubel FM, et al. Current Protocols in Molecular Biology. *Greene Publishing Assoc.*, Media, PA. ©1987, ©1989, ©1992.
- Barnes WM: PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA 91(6):2216-2220, 1994.
- Bayer EA, Morag E, Lamed R: The cellulosome--a treasure-trove for biotechnology. *Trends Biotechnol* 12 (9):379-86, (Sep) 1994.

ES 2 328 670 T3

- Bevan M: Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Research* 12(22):8711-21, 1984.
- Bird et al. *Plant Mol Biol* 11:651, 1988.
- 5 Blobel G, Walter P, Chang CN, Goldman BM, Erickson AH, Lingappa VR: Translocation of proteins across membranes: the signal hypothesis and beyond. *Symp Soc Exp Biol* 33:9-36, 1979.
- Brederode FT, Koper-Zawrthoff EC, Bol JF: Complete nucleotide sequence of alfalfa mosaic virus RNA 4. *Nucleic Acids Research* 8(10):2213-23, 1980.
- 10 Clark WG, Register JC 3d, Nejidat A, Eichholtz DA, Sanders PR, Fraley RT, Beachy RN: Tissue-specific expression of the TMV coat protein in transgenic tobacco plants affects the level of coat protein-mediated virus protection. *Virology* 179(2):640-7, (Diciembre) 1990.
- 15 Cole, et al.: Monoclonal antibodies and Cancer Therapy. *A.R. Liss*, Nueva York. © 1985.
- Coligan JE, et al.: Current Protocols in Immunology. *J. Wiley & Sons*, Nueva York. © 1996.
- Coruzzi G, Broglie R, Edwards C, Chua NH: Tissue-specific and light-regulated expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *EMBO J* 3(8):1671-9, 1984.
- 20 Cosgrove DJ: Inositol phosphate phosphatases of microbiological origin. Inositol phosphate intermediates in the defosforylation of the hexaphosphates of myo-inositol, scyllo-inositol, and D-chiro-inositol by a bacterial (*Pseudomonas sp.*) fitase. *Aust J Biol Sci* 23(6):1207-1220, 1970.
- 25 Dassa E, Cahu M, Desjoyaux-Cherel B, Boquet PL: The acid phosphatase with optimum pH of 2.5 of *Escherichia coli*. Physiological and Biochemical study. *J Biol Chem* 257(12):6669-76, (Jun 25) 1982.
- Davis LG, et al. Basic Methods in Molecular Biology. *Elsevier*, Nueva York, © 1986.
- 30 Duarte JC, Costa-Ferreira M: Aspergilli and lignocellulosics: enzymology and biotechnological applications. *FEMS Microbial Rev* 13(2-3):377-86, (Mar) 1994.
- Food Chemicals Codex, 4th Edition. Committee on Food Chemicals Codex, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academy of Sciences. Published: *National Academy Press*, Washington, DC, © 1996.
- Garcia PD, Ghrayeb J, Inouye M, Walter P: Wild type and mutant signal peptides of *Escherichia coli* outer membrane lipoprotein interact with equal efficiency with mammalian signal recognition particle. *J Biol Chem* 262(20):9463-8, (Julio 15) 1987.
- Gluzman Y: SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23(1):175-182, 1981.
- 40 Goeddel DV, Shepard HM, Yelverton E, Leung D, Crea R, Sloma A, Pestka S: Synthesis of human fibroblast interferon by *E. Coli*. *Nucleic Acids Research* 8(18):4057-4074, 1980.
- Goeddel DV, Spencer TM, Mangano ML, Adams TR, Daines RJ, Start WG, O'Brien JV, Chambers SA, Adams Jr. WR, Willets NG, Rice TB, Mackey CJ, Krueger RW, Kausch AP, Lemaux PG. *Plant Cell* 2:603, 1990.
- 45 Graf E: Phytic Acid: Chemistry and Applications. *Pilatus Press*, Minneapolis. 1986.
- Greiner R, Haller E, Konietzny U, Jany KD: Purification and characterization of a fitase from *Klebsiella terrigena*. *Arch Biochem Biophys* 341(2):201-6, (May 15) 1997.
- Greiner R, Konietzny U: Construction of a bioreactor to produce special breakdown products of phytate. *J Biotechnol* 48(1-2):153-9, (Julio 18) 1996.
- 50 Greiner R, Konietzny U, Jany KD: Purification and characterization of two fitases from *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 303(1):107-13, (May 15) 1993.
- Guilley H, Dudley RK, Jonard G, Balazs E, Richards KE: Transcription of Cauliflower mosaic virus DNA: detection of promoter sequences, and characterization of transcripts. *Cell* 30(3):763-73, 1982.
- Hespell RB, Whitehead TR: Physiology and genetics of xylan degradation by gastrointestinal tract bacteria. *J Dairy Sci* 73(10):3013-22, (Oct) 1990.
- 60 Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ, Schilperoort RA. *Nature* 303:179, 1983.

Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT. *Science* 227:1229, 1985.

Igarashi M, Hollander VP: Acid fosfatase from rat liver. Purification, crystallization, and properties. *J Biol Chem* 243(23):6084-9, (Dic. 10) 1968.

International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Nomenclature Committee: Enzyme nomenclature 1992: recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes/prepared for NC-IUBMB by Edwin C. Webb. Academic Press, c1992.

Jeffries TW: Biochemistry and genetics of microbial xylanases. *Curr Opin Biotechnol* 7(3):337-42, (Jun.) 1996.

Klee HJ, Muskopf YM, Gasser CS: Cloning of an *Arabidopsis thaliana* gen encoding 5-enolpyruylshikimate-3-phosphate syntase: analysis sequence and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. *Mol Gen Genet* 210 (3):437-42, (Dic) 1987.

Kohler G, Milstein C: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256 (5517):495-497, 1975.

Koster-Topfer M, Frommer WB, Rocha-Sosa M, Rosahl S, Schell J, Willmitzer L: A class II patatin promoter is under developmental control in both transgenic potato and tobacco plants. *Mol Gen Genet* 219(3):390-6, (Nov) 1989.

Kozbor. *Immunology Today* 4:72, 1983.

Lee B, Murdoch K, Topping J, Kreis M, Jones MG: Transient gen expression in aleurone protoplasts isolated from developing caryopses of barley and wheat. *Plant Mol Biol* 13(1):21-9, 1989.

National Research Council: Nutrient Requirements of Poultry (9th Revised ed.). National Academy Press, Washington, DC, 1994.

Nayini NR, Markakis P: *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 17:24-26, 1984.

NCBI, National Library of Medicine. National Institutes of Health: BLAST Sequence Similarity Searching (web site = www.ncbi.nlm.nih.gov).

Nelson TS, Shieh TR, Wodzinski RJ, Ware JH: Effect of supplemental fitase on the utilization of phytate phosphorus by chicks. *J Nutr* 101(10):1289-1293, 1971.

Ng DT, Walter P: Protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol* 6(4):510-6, (Ago), 1994.

Potrykus I: Gene transfer methods for plants and cell cultures. *Ciba Found Symp* 154:198-208; discussión 208-12, 1990.

Powar VK, Jagannathan V: Purification and properties of phytate-specific phosphatase from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 151(3):1102-1108, 1982.

Powers T, Walter P: The nascent polypeptide-associated complex modulates interactions between the signal recognition particle and the ribosome. *Curr Biol* 6(3):331-8, (Marzo 1), 1996.

Prade RA: Xylanases: from biology to biotechnology. *Biotechnol Genet Eng Rev*; 13:101-31, 1996.

Ryan AJ, Royal CL, Hutchinson J, Shaw CH: Genomic sequence of a 12S seed storage protein from oilseed rape (*Brassica napus* c.v. jet neuf). *Nucl Acids Res* 17(9):3584, 1989.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239(4839):487-491, 1988.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, *Cold Spring Harbor*, NY, ©1989.

SAS: Statistics In: SAS User's Guide (1984 ed.). SAS Institute, Carey, NC, 1984.

Schoner FJ, Hope PP, Schwarz G, Wiesche H: Comparative effects of microbial phytase and inorganic phosphorus on performance and retention of phosphorus, calcium, and crude ash in broilers. *J Anim Physiol Anim Nutr* 66:248, 1991.

- Schoner FJ, Hope PP, Schwarz G, Wiesche H:** Effects of microbial phytase and inorganic phosphate in broiler chicken: Performance and mineral retention at various calcium levels. *J Anim Physiol Anim Nutr* 69:235, 1993.
- 5 **Shieh TR, Wodzinski RJ, Ware JH:** Regulation of the formation of acid phosphatases by inorganic phosphate in *Aspergillus ficuum*. *J Bacteriol* 100(3):1161-5, (Dic) 1969.
- 10 **Shimamoto K, Miyazaki C, Hashimoto H, Izawa T, Itoh K, Terada R, Inagaki Y, Iida S:** Trans-activation and stable integration of the maize transposable element Ds cotransfected with the Ac transposase gen in transgenic rice plants. *Mol Gen Genet* 239(3):354-60, (Junio) 1993.
- 15 **Shimizu M:** Bioscience, *Biotechnology, and Biochemistry* 56:1266-1269, 1992.
- 20 **Sijmons PC, Dekker BM, Schrammeijer B, Verwoerd TC, van den Elzen PJ, Hoekema A:** Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. *Biotechnology (NY)* 8(3):217-21, 1990.
- 25 **Simons PC, Versteegh HA, Jongbloed AW, Kemme PA, Slump P, Bos KD, Wolters MG, Beudeker RF, Verschoor GJ:** Improvement of phosphoro availability by microbial phytase in broilers and pigs. *Br J Nutr* 64(2):525-540, 1990.
- 30 **Smeekens S, Weisbeek P, Robinson C:** Protein transport into and within chloroplasts. *Trends Biochem Sci* 15 (2):73-6, 1990.
- 35 **Smith AG, Gasser CS, Budelier KA, Fraley RT:** Identification and characterization of stamen- and tapetum-specific genes from tomato. *Mol Gen Genet* 222(1):9-16, (Junio) 1990.
- 40 **Tague BW, Dickinson CD, Chrispeels MJ:** A short domain of the plant vacuolar protein phytohemagglutinin targets invertase to the yeast vacuole. *Plant Cell* 2(6):533-46, (Junio) 1990.
- 45 **Tingey SV, Walker EL, Corruzzini GM:** Glutamine synthetase genes of pea encode distinct polypeptides which are differentially expressed in leaves, roots and nodules. *EMBO J* 6(1):1-9, 1987.
- 50 **Ullah AH:** Production, rapid purification and catalytic characterization of extracellular phytase from *Aspergillus ficuum*. *Prep Biochem* 18(4):443-458, 1988.
- 55 **Ullah AH, Gibson DM:** Extracellular phytase (E.C. 3.1.3.8) from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135: purification and characterization. *Prep Biochem* 17(1):63-91, 1987.
- 60 **Van den Broeck G, Timko MP, Kausch AP, Cashmore AR, Van Montagu M, Herrera-Estrella L:** Targeting of a foreign protein to chloroplasts by fusion to the transit peptide from the small subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase. *Nature* 313(6001):358-63, 1985.
- 65 **Vasil IK, Vasil V:** Totipotency and embryogenesis in plant cell and tissue cultures. *In Vitro* 8(3):117-27, (Nov-Dic) 1972.
- 70 **Vasil V, Vasil IK:** Regeneration of tobacco and petunia plants from protoplasts and culture of corn protoplasts. *In Vitro* 10:83-96, (Jul-Ago) 1974.
- 75 **Von Heijne G:** Towards a comparative anatomy of N-terminal topogenic protein sequences. *J Mol Biol* 189(1):239-42, 1986.
- 80 ***Walter P, Blobel G.** *Biochem Soc Symp* 47:183, 1986.
- 85 **Wenzler H, Mignery G, Fisher L, Park W:** Sucrose-regulated expression of a quimeric potato tuber gen in leaves of transgenic tobacco plants. *Plant Mol Biol* 13(4):347-54, 1989.
- 90 **Wolter FP, Fritz CC, Willmitzer L, Schell J, Schreier PH** rbcS genes in *Solanum tuberosum*: conservation of transit peptide and exon shuffling during evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 85(3):846-50, (Feb.) 1988.
- 95 **Wong KK, Tan LU, Saddler JN:** Multiplicity of beta-1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiol Rev* 52(3):305-17, (Sept.) 1988.
- 100 **Yamada K, et al.:** *Agricultural and Biological Chemistry* 32:1275-1282, 1968.
- 105 **USPN 3.297.548; Presentada el 28 de Julio de 1964; Expedida el 10 de Enero de 1967. Ware JH, Bluff L, Shieh TK:** Preparation of acid phytase.
- 110 **USPN 4.946.778; Presentada el 19 de Enero de 1989; Expedida el 7 de Agosto de 1990. Ladner RC, Bird RE, Hardman K:** Single polypeptide chain binding molecules.

ES 2 328 670 T3

EPO 120.516; Presentada el 21 de Feb. de 1984; Expedida el 3 de Oct de 1984. **Schilperoort RA, Hoekema A, Hooykaas RJ:** A process of the incorporation of foreign DNA into the genome of dicotyledonous plants; *Agrobacterium tumefaciens* bacteria and a process for the production thereof; plants and plant cells with modified genetic properties; a process for the preparation.

5 EPO 321.004; Presentada el 28 de Oct. de 1988; Expedida el 22 de Enero de 1992. **Vaara T, Vaara M, Simell M, Lehmussaari A, Caransa A:** A process for steeping cereals with a new enzyme preparation.

10 IPN WO 91/05053; Presentada el 27 de Sept. de 1990; Expedida el 18 de Abril de 1991. Van Gorcom R, et al.: Cloning and expression of microbial phytase.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 328 670 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido aislado, sintético o recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos representada en la Figura 8 como SEQ ID NO: 8, y que tiene una o más modificaciones de aminoácidos seleccionadas entre W68E, Q84W, A95P, K97C, S168E, N226C, Y277D o una cualquiera de sus combinaciones.
- 10 2. El polipéptido de la reivindicación 1, que carece de su péptido señal secretor homólogo.
- 15 3. El polipéptido de la reivindicación 1 o 2, donde el polipéptido está glicosilado.
- 20 4. Un polipéptido inmovilizado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 25 5. Un polinucleótido aislado, sintético o recombinante que codifica un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 30 6. Un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en forma sustancialmente purificada.
- 35 7. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la actividad del polipéptido es tolerante a temperaturas de al menos 60°C.
- 40 8. El polipéptido de reivindicación 7, donde la actividad del polipéptido es tolerante a temperaturas de al menos 70°C.
- 45 9. El polipéptido de reivindicación 8, donde la actividad del polipéptido es tolerante a temperaturas de al menos 80°C.
- 50 10. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el polipéptido tiene una vida media en el fluido gástrico al menos aproximadamente 2-veces mayor que el correspondiente polipéptido de tipo salvaje.
- 55 11. Un polinucleótido inmovilizado de acuerdo con la reivindicación 5.
- 60 12. Un sistema de expresión contenido en una célula anfitriona y que comprende un ácido nucleico:
 - a) que codifica el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; o,
 - b) el polinucleótido de la reivindicación 5;donde el sistema de expresión comprende una secuencia de control de la transcripción operable en una célula anfitriona, comprendiendo opcionalmente dicha secuencia de control un promotor constitutivo o un promotor específico de tejidos.
- 65 13. El sistema de expresión de la reivindicación 12, donde el ácido nucleico comprende una secuencia que codifica un péptido señal y el péptido señal es un péptido señal PR-S de la proteína PR del tabaco.
- 70 14. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 5 o el sistema de expresión de la reivindicación 12 o la reivindicación 13.
- 75 15. El vector de la reivindicación 14, donde el vector es viral o bacteriano.
- 80 16. Una célula anfitriona que comprende el vector o sistema de expresión de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, o un ácido nucleico heterólogo que comprende un polinucleótido de la reivindicación 5.
- 85 17. Una célula anfitriona de la reivindicación 16, donde la célula es una célula procariótica, una célula eucariótica o una célula vegetal.
- 90 18. Una célula anfitriona de acuerdo con cualquier reivindicación 16 o 17, donde la célula es:
 - a) una célula de levadura seleccionada entre *Saccharomyces* o *Pichia* spp.; o
 - b) una célula de *E. coli*, *P. pastoris*, o *S. pombe*.
- 95 19. Una célula vegetal, una porción de una planta, un órgano de una planta, una semilla de una planta o una planta modificada para que comprenda:
 - a) un sistema de expresión recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica una fitasa que tiene la secuencia mostrada en la reivindicación 5;

ES 2 328 670 T3

- 5 b) el sistema de expresión de la reivindicación 12 o la reivindicación 13;
c) el vector de la reivindicación 14 o la reivindicación 15; o
d) la célula anfitriona de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18.
- 10 20. Un producto alimenticio que comprende un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o codificado por un polinucleótido de la reivindicación 5, o una célula vegetal modificada, una parte de una planta, un órgano de una planta, una semilla de una planta o una planta de la reivindicación 19.
- 15 21. Un producto alimenticio de la reivindicación 20, donde el producto alimenticio es un alimento para animales, un aditivo para alimento para animales, comida para seres humanos o aditivo para comida para seres humanos.
- 20 22. Un método *in vitro* de tratamiento de material que contiene fitato que comprende poner en contacto el material que contiene fitato con un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o codificado por un polinucleótido de la reivindicación 5.
- 25 23. Un producto combinado para agua de bebida o alimento para animales en forma líquida que comprende mezclas minerales y mezclas de vitaminas, así como un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o codificado por un polinucleótido de la reivindicación 5.
- 30 24. Una composición coadyuvante de la dieta que comprende un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o codificado por un polinucleótido de la reivindicación 5.
- 35 25. La composición coadyuvante de la dieta de la reivindicación 24, que comprende adicionalmente un portador biocompatible, donde el portador biocompatible es un portador biodegradable o uno no biodegradable.
- 40 26. La composición coadyuvante de la dieta de cualquiera de las reivindicaciones 24 o 25, donde la composición coadyuvante de la dieta es líquida o seca.
- 45 27. La composición coadyuvante de la dieta de cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26, que comprende adicionalmente un aditivo, donde opcionalmente el aditivo comprende una sal, un azúcar, un conservante, un agente para el ajuste del pH, una proteína o un fitato.
- 50 28. Un coadyuvante de la dieta de una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 27, donde el portador biocompatible es un portador comestible.
- 55 29. Un método para hidrolizar fitato en un material excremental que contiene fitato que comprende:
a) proporcionar un ácido nucleico que codifica una fitasa como se muestra en la reivindicación 5 o un polipéptido que tiene actividad fitasa que tiene una secuencia como la mostrada en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4; y
b) poner en contacto un material excremental que contiene fitato con la fitasa de a), de manera que la fitasa hidroliza el fitato del material excremental que contiene fitato.
- 60 30. Un método para mejorar el valor nutricional de un producto alimenticio que contiene fitato que comprende:
poner en contacto dicho producto alimenticio que contiene fitato con un polipéptido que tiene actividad fitasa como se muestra en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o un ácido nucleico que codifica un polipéptido como se muestra en la reivindicación 5, de manera que el polipéptido cataliza la liberación de fosfato inorgánico desde el fitato en dicho producto alimenticio que contiene fitato
- 65 31. Un método de la reivindicación 30, donde el polipéptido que tiene actividad fitasa es producido mediante:
a) un sistema de expresión recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica una fitasa que tiene la secuencia mostrada en la reivindicación 5;
b) el sistema de expresión de la reivindicación 12 o la reivindicación 13;
c) el vector de la reivindicación 14 o la reivindicación 15; o
d) la célula anfitriona de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18,
donde la expresión del polipéptido conduce a la producción de polipéptido que tiene actividad fitasa.

ES 2 328 670 T3

32. Un método de la reivindicación 30 o 31, donde la liberación del fosfato inorgánico desde el fitato en dicho producto alimenticio que contiene fitato se produce antes de, después de, o parcialmente antes de y parcialmente después de, la ingestión de dicho producto alimenticio que contiene fitato por un organismo receptor.

5 33. Un método para producir un alimento para animales que comprende fitasa que comprende:

- a) cultivar la célula vegetal, la parte de la planta, o la planta de la reivindicación 19; y
- b) convertir la célula vegetal, parte de planta o planta en una composición adecuada alimento para animales.

10 34. Un organismo no humano transgénico cuyo genoma comprende una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica un polipéptido que tiene actividad fitasa, donde el ácido nucleico heterólogo comprende un ácido nucleico que tiene una secuencia como se muestra en la reivindicación 5, y la expresión de dicho transgén da como resultado la expresión de un polipéptido de fitasa.

15 35. Una comida, alimento, suplemento para comida, suplemento para alimento o suplemento de la dieta que comprende un polipéptido que tiene actividad fitasa que comprende una secuencia como se muestra en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o codificado por el polinucleótido de la reivindicación 5.

20 36. Una composición que comprende un polipéptido que tiene una actividad fitasa que comprende una secuencia como se muestra en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o codificado por el polinucleótido de la reivindicación 5.

25 37. La composición de la reivindicación 36, en forma de bolita, comprimido, líquido, cápsula, jarabe, emulsión, gragea, aderezo o liposoma.

38. Una composición de las reivindicaciones 36 o 37, donde la fitasa es termotolerante o termoestable.

39. Una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 36 a 38, donde la composición es comestible.

30 40. Una composición de la reivindicación 39, que comprende adicionalmente almidón de maíz, lactosa, sacarosa, escamas de soja, aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o propilenglicol.

35 41. Una bolita comestible que comprende un polipéptido que tiene actividad fitasa que comprende una secuencia como se muestra en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o codificado por el polinucleótido de la reivindicación 5.

40 42. Una harina orgánica que comprende un polipéptido que tiene actividad fitasa que comprende una secuencia como se muestra en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o codificado por el polinucleótido de la reivindicación 5.

45 43. Una harina orgánica de la reivindicación 42, donde la harina orgánica comprende maíz, soja o una mezcla de harina de maíz y soja.

48. Una composición de liberación lenta o liberación sostenida, o de liberación inmediata o rápida, que comprende un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o codificado por el polinucleótido de la reivindicación 5.

50 45. Una composición líquida o seca que comprende un polipéptido que tiene actividad fitasa que comprende una secuencia como se muestra en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o codificado por el polinucleótido de la reivindicación 5.

55 46. Un producto alimenticio bebible o bebida alcohólicos o no alcohólicos que comprenden un polipéptido que tiene actividad fitasa que comprende una secuencia como se muestra en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o codificado por el polinucleótido de la reivindicación 5.

47. Un método para producir un producto alimenticio que contiene una fitasa que comprende:

- a) proporcionar un polipéptido que tiene actividad fitasa que comprende una secuencia como se muestra en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o codificado por el polinucleótido de la reivindicación 5;
- b) proporcionar una composición adecuada para productos alimenticios; y
- c) combinar a) y b).

65 48. Un método de la reivindicación 30 o 47 donde el producto alimenticio es un alimento para animales, un aditivo para alimento para animales, comida para seres humanos o un aditivo para comida para seres humanos.

ES 2 328 670 T3

49. Un método para elaborar una fitasa que comprende:

proporcionar un polinucleótido que codifica una fitasa como se muestra en la reivindicación 5; y, expresar el polinucleótido en condiciones que permiten la expresión de la fitasa.

5

50. Una microcuenta porosa, o un granulado de enzima o un granulado por aglomeración, que comprende, un polipéptido que tiene actividad fitasa que tiene una secuencia como se muestra en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o codificado por el polinucleótido de la reivindicación 5.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 328 670 T3

FIGURA 1

(SEQ ID NO: 1-secuencia de nucleótios y SEQ ID NO: 2-secuencia de aminoácidos)

Secuencia de Fitasa de *Escherichia coli* B

1
ATG AAA GCG ATC TTA ATC CCA TTT TTA TCT CTT CTG ATT CCG TTA ACC CCG
Met Lys Ala Ile Leu Ile Pro Phe Leu Ser Leu Leu Ile Pro Leu Thr Pro

CAA TCT GCA TTC GCT CAG AGT GAG CCG GAG CTG AAG CTG GAA AGT GTG GTG
Gln Ser Ala Phe Ala Gln Ser Glu Pro Glu Leu Lys Leu Glu Ser Val Val

ATT GTC AGT CGT CAT GGT GTG CGT GCT CCA ACC AAG GCC ACG CAA CTG ATG
Ile Val Ser Arg His Gly Val Arg Ala Pro Thr Lys Ala Thr Gln Leu Met

CAG GAT GTC ACC CCA GAC GCA TGG CCA ACC TGG CCG GTA AAA CTG GGT TGG
Gln Asp Val Thr Pro Asp Ala Trp Pro Thr Trp Pro Val Lys Leu Gly Trp

CTG ACA CCG CGN GGT GGT GAG CTA ATC GCC TAT CTC GGA CAT TAC CAA CGC
Leu Thr Pro Arg Gly Gly Glu Leu Ile Ala Tyr Leu Gly His Tyr Gln Arg

CAG CGT CTG GTA GCC GAC GGA TTG CTG GCG AAA AAG GGC TGC CCG CAG TCT
Gln Arg Leu Val Ala Asp Gly Leu Leu Ala Lys Lys Gly Cys Pro Gln Ser

GGT CAG GTC GCG ATT ATT GCT GAT GTC GAC GAG CGT ACC CGT AAA ACA GGC
Gly Gln Val Ala Ile Ala Asp Val Asp Glu Arg Thr Arg Lys Thr Gly

GAA GCC TTC GCC GCC GGG CTG GCA CCT GAC TGT GCA ATA ACC GTA CAT ACC
Glu Ala Phe Ala Ala Gly Leu Ala Pro Asp Cys Ala Ile Thr Val His Thr

CAG GCA GAT ACG TCC AGT CCC GAT CCG TTA TTT AAT CCT CTA AAA ACT GGC
Gln Ala Asp Thr Ser Ser Pro Asp Pro Leu Phe Asn Pro Leu Lys Thr Gly

GTT TGC CAA CTG GAT AAC GCG AAC GTG ACT GAC GCG ATC CTC AGC AGG GCA
Val Cys Gln Leu Asp Asn Ala Asn Val Thr Asp Ala Ile Leu Ser Arg Ala

GGA GGG TCA ATT GCT GAC TTT ACC GGG CAT CGG CAA ACG GCG TTT CGC GAA
Gly Gly Ser Ile Ala Asp Phe Thr Gly His Arg Gln Thr Ala Phe Arg Glu

CTG GAA CGG GTG CTT AAT TTT CCG CAA TCA AAC TTG TGC CTT AAA CGT GAG
Leu Glu Arg Val Leu Asn Phe Pro Gln Ser Asn Leu Cys Leu Lys Arg Glu

AAA CAG GAC GAA AGC TGT TCA TTA ACG CAG GCA TTA CCA TCG GAA CTC AAG
Lys Gln Asp Glu Ser Cys Ser Leu Thr Gln Ala Leu Pro Ser Glu Leu Lys

GTG AGC GCC GAC AAT GTC TCA TTA ACC GGT GCG GTA AGC CTC GCA TCA ATG
Val Ser Ala Asp Asn Val Ser Leu Thr Gly Ala Val Ser Leu Ala Ser Met

CTG ACG GAG ATA TTT CTC CTG CAA CAA GCA CAG GGA ATG CCG GAG CCG GGG
Leu Thr Glu Ile Phe Leu Leu Gln Gln Ala Gln Gly Met Pro Glu Pro Gly

TGG GGA AGG ATC ACC GAT TCA CAC CAG TGG AAC ACC TTG CTA AGT TTG CAT
Trp Gly Arg Ile Thr Asp Ser His Gln Trp Asn Thr Leu Leu Ser Leu His

AAC GCG CAA TTT TAT TTG CTA CAA CGC ACG CCA GAG GTT GCC CGC AGC CGC
Asn Ala Gln Phe Tyr Leu Leu Gln Arg Thr Pro Glu Val Ala Arg Ser Arg

ES 2 328 670 T3

GCC ACC CCG TTA TTG GAT TTG ATC ATG GCA GCG TTG ACG CCC CAT CCA CCG
Ala Thr Pro Leu Leu Asp Leu Ile Met Ala Ala Leu Thr Pro His Pro Pro

CAA AAA CAG GCG TAT GGT GTG ACA TTA CCC ACT TCA GTA CTG TTT ATT GCC
Gln Lys Gln Ala Tyr Gly Val Thr Leu Pro Thr Ser Val Leu Phe Ile Ala

GGA CAC GAT ACT AAT CTG GCA AAT CTC GGC GGC GCA CTG GAG CTC AAC TGG
Gly His Asp Thr Asn Leu Ala Asn Leu Gly Gly Ala Leu Glu Leu Asn Trp

ACG CTT CCC GGT CAG CCG GAT AAC ACG CCG CCA GGT GGT GAA CTG GTG TTT
Thr Leu Pro Gly Gln Pro Asn Thr Pro Pro Gly Gly Glu Leu Val Phe

GAA CGC TGG CGT CGG CTA AGC GAT AAC AGC CAG TGG ATT CAG GTT TCG CTG
Glu Arg Trp Arg Arg Leu Ser Asp Asn Ser Gln Trp Ile Gln Val Ser Leu

GTC TTC CAG ACT TTA CAG CAG ATG CGT GAT AAA ACG CCG CTG TCA TTA AAT
Val Phe Gln Thr Leu Gln Gln Met Arg Asp Lys Thr Pro Leu Ser Leu Asn

ACG CCG CCC GGA GAG GTG AAA CTG ACC CTG GCA GGA TGT GAA GAG CGA AAT
Thr Pro Pro Gly Glu Val Lys Leu Thr Leu Ala Gly Cys Glu Glu Arg Asn

GCG CAG GGC ATG TGT TCG TTG GCA GGT TTT ACG CAA ATC GTG AAT GAA GCA
Ala Gln Gly Met Cys Ser Leu Ala Gly Phe Thr Gln Ile Val Asn Glu Ala

CGC ATA CCG GCG TGC AGT TTG AGA TCT CAT CAC CAT CAC CAT CAC TAA 1323
Arg Ile Pro Ala Cys Ser Leu Arg Ser His His His His His His End

FIGURA 2
Perfil de pH/Temperatura y Estabilidad

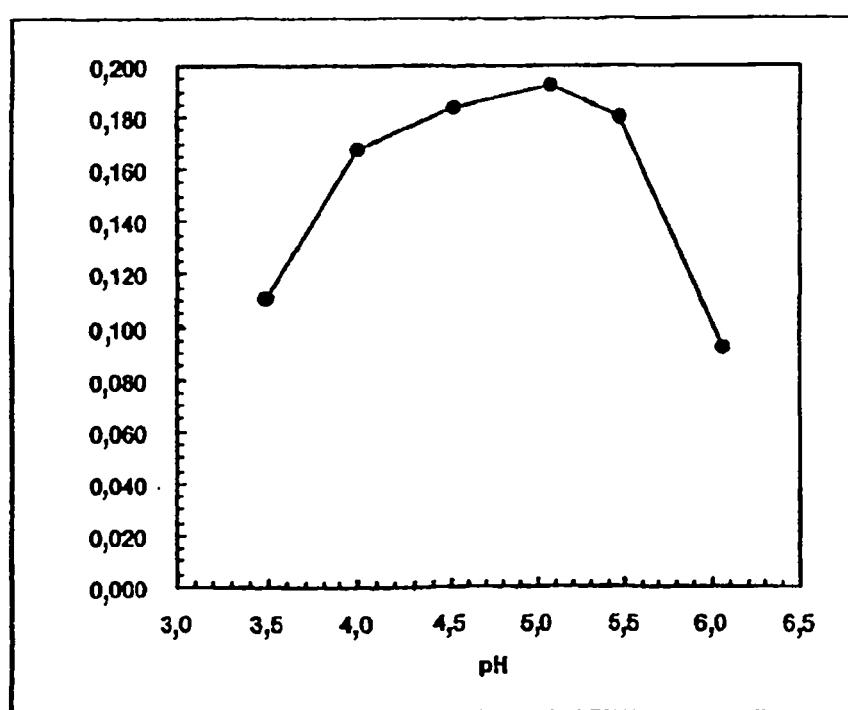
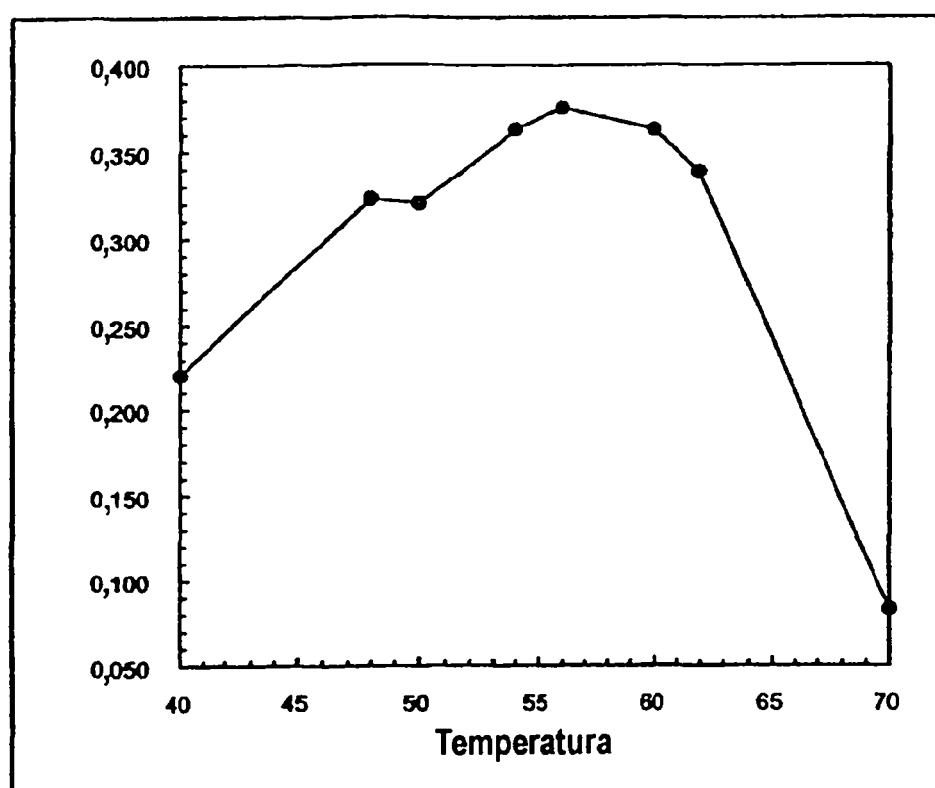


FIGURA 3

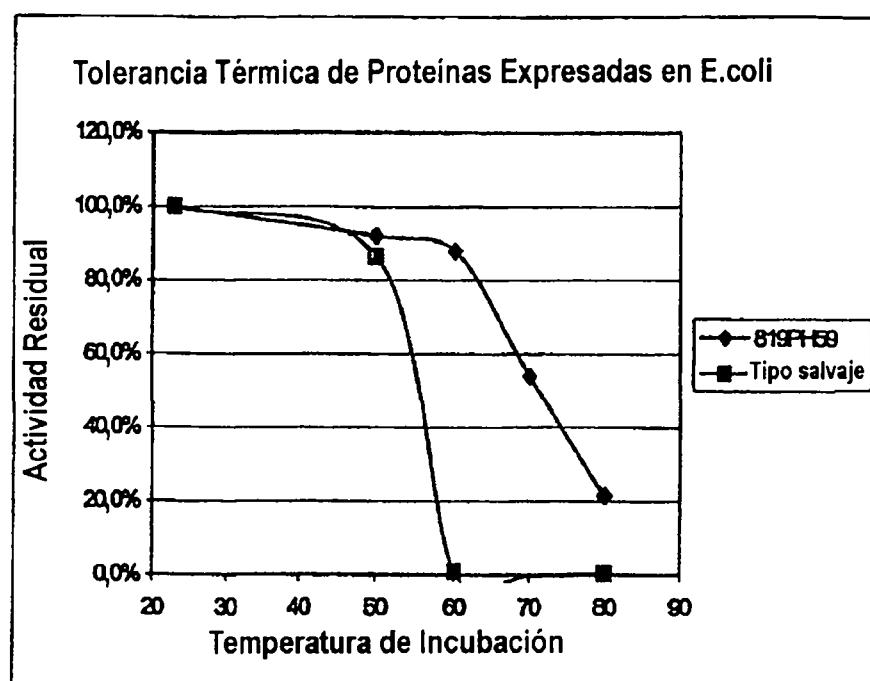


FIGURA 4

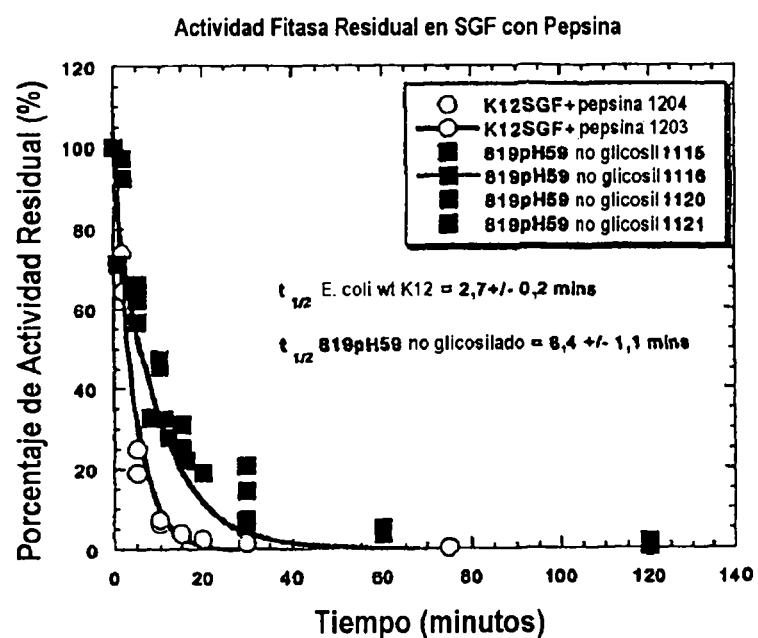


FIGURA 5

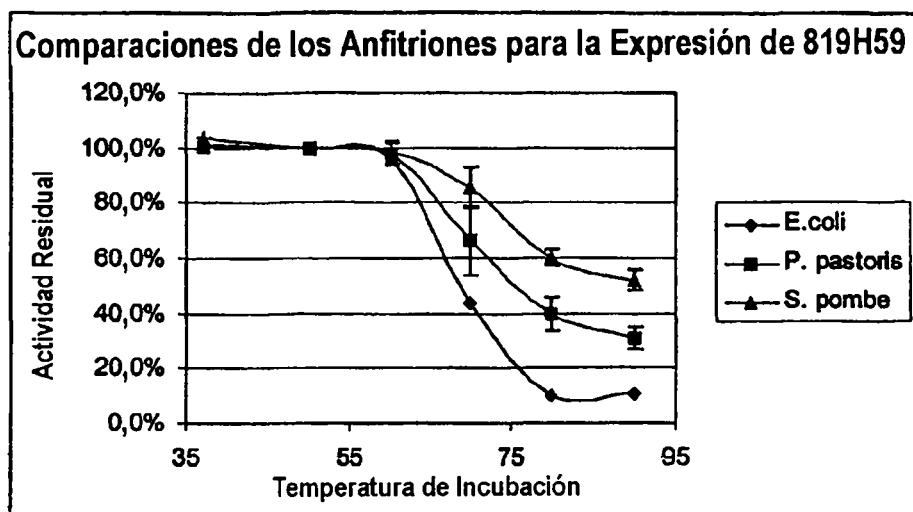


FIGURA 6

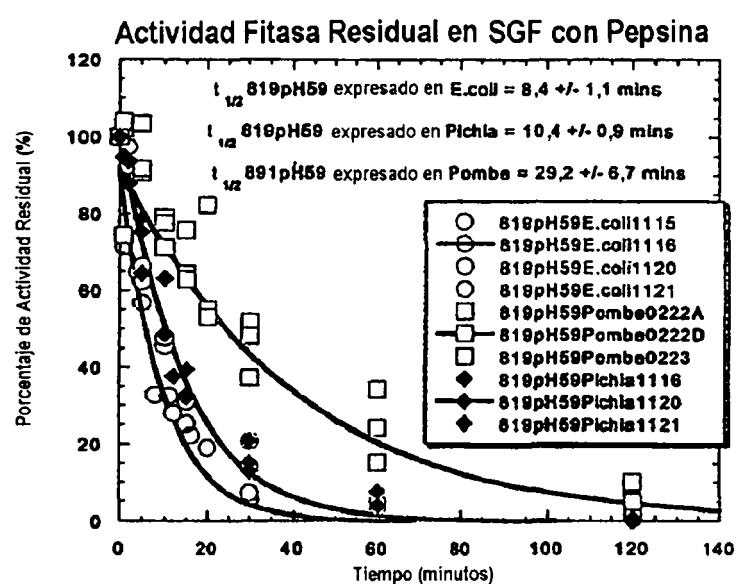


FIGURA 7A**E. coli appA (Núm. de Acceso GenBank M58708) (SEQ ID NO: 7)**

1 taaggagcag aaacaatgtg gtatttacit tggtcgtcg gcattttgtt gatgtgttcg
 61 ctctccaccc ttgtgttgtt atggctggac ccgcgtctga aaagttaacg aacgttagcc
 121 tcatgcggcg cattagcata gcatcaggea atcaataatg tcagatatga aaagcggaaa
 181 catatcgatg aaagcgatct taafcccait ttatctctt ctgattccgt taaccccgca
 241 atctgcattc gctcagatgt agccggagct gaagctggaa agtgtgtga ttgtcagtcg
 301 tcaatgggtgtc cgtgtccaa ccaaggccac gcaactgtat caggatgtca cccagacgc
 361 atggccaacc tggccgttaa aactgggttg gctgacaccg cgnggtgtg agctaattgc
 421 ctatctcgga cattaccaac gccagcgctt ggtagccgac ggattgtgtt cggaaaaagg
 481 ctgcccgcag tctggtcagg tcgcgtat tgctgtatc gacgagcgta cccgtaaaac
 541 aggccaaagcc ttgcgcggcg ggctggcacc tgactgtgcata accgtac ataccaggc
 601 agatacgtcc agtcccgatc cgttatitaa tcctctaaaaa actggcggtt gccaactgg
 661 taacgcgaac gtgactgacg cgatccctcg cagggcagga gggtaatttgcgttac
 721 cgggcattcg caaacggcg ttcgcaact ggaacgggtt cttatatttc cgcaatcaaa
 781 cttgtgcctt aaacgtgaga aacaggacga aagctgtca ttaacgcagg cattaccatc
 841 ggaactcaag gtgagccgcg acaatgttc attaaccgtt gggtaaggcc tcgcataat
 901 gctgacggag atatctcc tgcaacaacg acaggaaatc cggagccgg ggtggggaaag
 961 gatcaccgtat tcacaccgtt ggaacaccctt gtaatgttg cataacgcgc aattttttt
 1021 gctacaacgc acgcccagggttccgcgcg ccgcgcacc ccgttatttag atttgatcaa
 1081 gacagcggtt aogccccatc cacccggaaaa acaggcgat ggtgtgacat tacccacttc
 1141 agtgcgttt atcgccggac acgataactaa tctggcaat ctggccggcg cactggagct
 1201 caacggacg ctcccggtc agccggataa cacggccca ggtgtgttac tgggtgttgc
 1261 acgctggcg tggctaaatc ataacagccat gtggatttcg gtttcgttgc tcttccagac
 1321 ttacagcag atgcgttataa aaacgcgtt gtcattaaat acggccccc gagagggtgaa
 1381 actgacccttg gcaggatgtt aagagcgaaa tgcgcaggcc aigtgttgcgt tggcagggtt
 1441 tacgcaaattc gtgaatgaag cacgcatacc ggcgtgcgtt ttgtatgcataaaaaaagg
 1501 cattcagtta cttgtatgtt ctggggcttga tgacaaacgaa agaactgtt aatgcgtt
 1561 ccggaaaagg cgttcacgcc gcatcggcc acgttgcgtt tccttccgcg tggagtaac
 1621 tataaccgttta atagttatag ccgttaatgtt aagcgggttgcgtt ggcgttta atcacaccat
 1681 tgaggatgttgcgcgttataa ttgcgcgttgcgtt ccgttccag acgtgcattt gacaaactca
 1741 ctccttggc ggtgttcaag cccaaacgcg caaccaggcag gtcgggttgcac aacggcc
 1801 ccacgaccgc ggcgttccgc accgcgttgcgttgcgttgcacaaatc accagatcgt
 1861 aatggtcgtt cggccattcc agtaatttgc gcatccgttca

FIGURA 7B

1 taaggaggcag aaacaatgtg gtatttactt tggttcgtcg gcatttttgtt gatgttgtcg
61 ctctccaccc ttgtgttgtt atggctggac ccgcgtctga aaagtaacg aacgttaggccc
121 tgaatcgccgc cattagcatc gcatcaggca atcaataatg tcagatgtga aaagcggaaa
181 cataatcgatg aaagcgatct taatccatt ttatcttctt ctgtatccgt taaccggca
241 atctgcattc gtcagatgt agccggagct gaagctggaa aatgttgtga ttgtcagtcg
301 tcatgggtgt cggtgtccaa ccaaggccac gcaactgtatc caggatgtca cccccagacgc
361 atggccaacc tggccgttaa aactgggttg gtcgacacccg cgggggttg agctaattcgc
421 ctatctcgga cattaccaac gccagcgctt ggtagccgac ggattgtctt cggaaaaagg
481 ctgcccccgatc tctggtcagg tcgcgattat tgctgtatgc gacgagcgta cccgtaaaaac
541 aggccgaagcc ttgcggcccg ggctggcacc tgactgtgca ataaccgtac atacccaggc
601 agatacgatc agtcccgatc cgttatttaa tcctctaaaaa actggcggtt gccaactgg
661 taacgcgaac gtgactgtac cgatccatcg cagggcagga gggtaattt ctgactttac
721 cgggcattcg caaacggcgt ttgcgaact ggaacgggtt cttaatttc cgcaatcaaa
781 cttgtgcctt aaacgtgaga aacaggacga aagctgtca ttaacgcagg cattaccatc
841 ggaactcaag gtgagcgcgg acaatgtctc attaaccgggt gcggtaaagcc tcgcatcaat
901 gctgacggag atatcttcc tgcaacaagc acagggaatg cggagccgg ggtggggaaag
961 gatcaccatc acacaccatc ggaacaccctt gctaagtgtt cataacgcgc aattttattt
1021 gctacaacgc acgccagagg ttggccgcag ccgcgcacc cccgttattt tagtgcataa
1081 gacagcggtt acggcccatc caccgcaaaaa acaggcgat ggtgtgacat tacccacttc
1141 agtgcgtttt atcgccggac acgatactaa tctggcaaat ctggccggcg cactggagct
1201 caactggacg ctccggcgc agccggataa cacggccca gggtgtgaac tgggttgtt
1261 acgctggcgtt cggctaagcg ataacagcca gtggatttcag gtggatccgtt ctccacagac
1321 ttacagcag atgcgtataa aacggcgctt gtcattaaat acggccccc gagagggtt
1381 actgaccctg gcaggatgtt aagagcgaaaa tggcggggc atgtgttgtt tggcagggtt
1441 tacgcaatc gtgaaatggc aacgcatacc ggcgtgcgtt tgtaatgtca aaaaaaagg
1501 cattcagttt cctgaatgtt ctggatgttga tgacaaacga agaactgtctt aatgcgttaga
1561 cggggaaaagg cgttacgcgc gcatccggcc acitccatgtt ttcttccatc tggaggtt
1621 tataaccgtt atagttatag ccgttaactgtt aagcggtgtt ggcgcgtttt atcacaccat
1681 tgaggatagc gctttaata ttgacgcctg cctgttccatc acgctgcattt gacaaactca
1741 cctctttggc ggtgttcaag cccaaacgcgc caaccaggcag gctgggtccca acagaacgc
1801 ccacgaccgc ggcataactc accggcagca tggccggcgtt atcgacaaatc accagatgtt
1861 aatggtcgtt cggccatcc agtaatttgc gcatccgtt g

FIGURA 8

Secuencia de aminoácidos para E. coli appA (tipo salvaje) (SEQ ID NO: 8)

MKAILIPFLSLLIPLTPQSAFAQSEPELKLESVVIVSRHGVRAPTKATQLMQDVTPDAWP
TWPVKLGWLTPRGELIAYLGHYQRQRLVADGLLAKKGCPQSGQVAIIADVDERTRK
TGEAFAAGLAPDCAITVHTQADTSSPDPLFNPLKTGVQCQLDNA
NVTDAILSRAGGSIADFTGHRQTAFRELERVNFPQSNLCLKREKQDESCSLTQALPSE
LKVSADNVSLTGAVSLASMLTEIPLLQQAQGMPEPGWGRITDSHQWNTLLSLHNAQFY
LLQRTPEVARSRATPLLDLIKTALTPHPPQKQAYGVTLPTSVLFIAGHDTNLANLGGAL
ELNWTLPGQPDNTPPGELVFERWRRLSDNSQWIQVSLVFQTLQQMRDKTPLSLNTPP
GEVKLTLAGCEERNAQGMCSLAGFTQIVNEARIPACSL

Más abajo se muestran los residuos de aminoácido en negrita-subrayados de la enzima appA (SEQ ID NO: 10)

MKAILIPFLSLLIPLTPQSAFAQSEPELKLESVVIVSRHGVRAPTKATQLMQDVTPDAWP
TWPVKLGELTPRGELIAYLGHYWRQRLVADGLLPKCGCPQSGQVAIIADVDERTRK
TGEAFAAGLAPDCAITVHTQADTSSPDPLFNPLKTGVQCQLDNA
NVTDAILEAGGSIADFTGHYQTAFRELERVNFPQSNLCLKREKQDBCSLTQALPSE
KVSADQVSLTGAVSLASMLTEIPLLQQAQGMPEPGWGRITDSHQWNTLLSLHNAQFDL
QRTPEVARSRATPLLDLIKTALTPHPPQKQAYGVTLPTSVLFIAGHDTNLANLGGAEL
NWTLPQPDNTPPGELVFERWRRLSDNSQWIQVSLVFQTLQQMRDKTPLSLNTPPG
VKLTLAGCEERNAQGMCSLAGFTQIVNEARIPACSL