

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 806 748**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/00** (2006.01)

**C12P 19/34** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**C12N 9/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.03.2014 PCT/US2014/022432**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.10.2014 WO14164442**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2014 E 14780237 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 2970925**

54 Título: **Fitasa**

30 Prioridad:

**12.03.2013 US 201361777139 P**  
**16.05.2013 GB 201308828**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**18.02.2021**

73 Titular/es:

**BASF ENZYMES LLC (100.0%)**  
**3550 John Hopkins Court**  
**San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**TAN, XUQIU y**  
**SOLBAK, ARNE, I.**

74 Agente/Representante:

**VIDAL GONZÁLEZ, Maria Ester**

**ES 2 806 748 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Fitasa

## 5 Campo de la invención

Se proporcionan polipéptidos que tienen actividad de fitasa y secuencias de polinucleótidos que codifican la fitasa. En particular, las secuencias proporcionan niveles aumentados de expresión de una fitasa que tiene alta actividad específica, alta termoestabilidad, alta termotolerancia y diversos usos industriales de la fitasa.

10

Breve descripción de los dibujos

15 Figura 1: La actividad específica (U/mg) se determinó en ácido fítico (pH 5,5) con proteína purificada. *Pichia* expresó fitasas: SEQ ID NO:8 (codificado por SEQ ID NO:7), SEQ ID NO:3 (codificado por SEQ ID NO:2), y SEQ ID NO:6 (codificado por SEQ ID NO:5) y las *Pseudomonas* expresaron fitasas: SEQ ID NO:3 (codificado por SEQ ID NO:1) y SEQ ID NO:6 (codificado por SEQ ID NO:4).

20 Figura 2: Cromatograma DSC para fitasa SEQ ID NO:3 (codificado por SEQ ID NO:1) en Citrato 100 mM pH 5,5 + 10 % Sorbitol-10 % NaCl.

25 Figura 3: valores de  $T_m$  (°C) de DSC para la fitasa en 100 mM de Citrato pH 5,5 con y sin 10 % de Sorbitol-10 % NaCl. SEQ ID NO:3 (codificado por SEQ ID NO:1) y SEQ ID NO:6 (codificado por SEQ ID NO:4) se expresan con *Pseudomonas*. SEQ ID NO:3 (codificado por SEQ ID NO:2), SEQ ID NO:6 (codificado por SEQ ID NO:5) y SEQ ID NO:8 (codificado por SEQ ID NO:7) se expresan con *Pichia*.

30 Figura 4: Perfil de pH de las fitasas mediante el uso del tampón "universal" Britton-Robinson en fitato 4 mM. SEQ ID NO:3 (codificado por SEQ ID NO:1) y SEQ ID NO:6 (codificado por SEQ ID NO:4) se expresan con *Pseudomonas*. SEQ ID NO:3 (codificado por SEQ ID NO:2) y SEQ ID NO:6 (codificado por SEQ ID NO:5) se expresan con *Pichia*.

35 Figura 5: SDS-PAGE de fitasas tratadas con SGF + pepsina. SEQ ID NO:3 (codificado por SEQ ID NO:1) y SEQ ID NO:6 (codificado por SEQ ID NO:4) se expresan con *Pseudomonas*. SEQ ID NO:3 (codificado por SEQ ID NO:2), SEQ ID NO:6 (codificado por SEQ ID NO:5) y SEQ ID NO:8 (codificado por SEQ ID NO:7) se expresan con *Pichia*.

40 Figura 6: Actividad de fitasas termoestables después del tratamiento con SGF. Se observa una pérdida de actividad mínima o nula para las fitasas termoestables. La muestra T0 se inactivó previamente con el tampón de pH 11 antes de la adición de la enzima fitasa.

45 Figura 7: Niveles de expresión de la fermentación de fitasa (30L) en *Pseudomonas* (P.f.).

Descripción

45 La fitasa es una enzima fosfórica monoéster de hidrolasa que cataliza la hidrólisis del ácido fítico (mio-inositol-hexakisfosfato) a fósforo e inositol. De acuerdo con las recomendaciones del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) y Bairoch A., "The ENZYME database in 2000," Nucleic Acids Res 28:304-305(2000), una fitasa se clasifica por la Comisión de Enzimas (EC) como Número EC 3.1.3.8, y se conoce, además, como: 1-fitasa; mio-inositol- hexakisfosfato 3-fosfohidrolasa; fitato 1-fosfatasa; fitato 3-fosfatasa; o fitato 6-fosfatasa. La fitasa se clasifica, además, como EC 3.1.3.26, que se conoce, además, como: 4-fitasa; 6-fitasa (nombre basado en el sistema de numeración 1L y no en la numeración 1D); o fitato 6-fosfatasa. La fitasa se clasifica, además, como EC 3.1.3.72, que se conoce, además, como 5-fitasa. La fitasa se conoce, además, como fosfatasa ácida de histidina (HAP); fitasa de hélice  $\beta$ ; fosfatasa ácida púrpura (PAP); y fosfatasa de proteína tirosina (PTP). Los nombres alternativos para la fitasa serán conocidos por los expertos en la técnica.

55 La fitasa es un ejemplo de una enzima que puede tener un efecto como suplemento en los gránulos de pienso animal. La fitasa degrada el ácido fítico en un núcleo de mio-inositol y una o más moléculas de fosfato libres. El ácido fítico consiste en un núcleo de mio-inositol al cual están unidos covalentemente seis grupos fosfato. El ácido fítico es un componente del material vegetal, como las semillas del frijol de soja, que se utilizan para generar gránulos de pienso para animales tales como animales no rumiantes, por ejemplo, aves de corral, pollos de engorde, aves, pollos, ponedoras, pavos, patos, gansos y volatería; animales rumiantes, por ejemplo vacas, ganado vacuno, caballos y ovejas; puercos, cerdos, lechones, cerdos en crecimiento y cerdas; animales de compañía que incluyen, entre otros: gatos, perros, roedores y conejos; peces, entre otros, salmón, trucha, tilapia, bagre y carpa; y crustáceos, incluidos, entre otros, camarones y langostinos. Debido a que estos animales no pueden digerir el ácido fítico, el ácido fítico tiene una serie de efectos perjudiciales. El quelata los cationes divalentes como el calcio y el magnesio, y su fosfato no está biológicamente disponible para los animales que se alimentan, lo que resulta en la necesidad de complementar la dieta animal con estos nutrientes a pesar de ser abundantes en la materia prima del

65

pienso. Además, debido a que estos nutrientes pasan sin digerir a través del animal, ellos están disponibles para los descomponedores más abajo en la cadena alimentaria capaces de degradar el ácido fítico, lo que da como resultado, por ejemplo, floraciones de algas en las aguas superficiales con las que el efluente animal entra en contacto.

5 Los animales no rumiantes tales como pollos, cerdos y peces no pueden acceder a suficiente fósforo de los alimentos, necesario para un crecimiento rápido, ya que ellos no producen naturalmente las enzimas fitasas necesarias para liberar el fósforo del ácido fítico que se encuentra en los alimentos. Solo se usa una pequeña cantidad de fósforo a partir de los alimentos de origen vegetal y semillas, porque la mayor parte del fósforo está presente en forma de grupos fosfato del ácido fítico (fitato). Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar fósforo a los animales para aumentar su crecimiento.

10 Una solución es agregar suplementos de fósforo inorgánico al pienso animal; sin embargo, el uso de suplementos de fósforo inorgánico conduce a una mayor cantidad de fosfato excretado del animal y al medio ambiente, lo que conduce a la contaminación de las fuentes de agua.

15 Otra solución es proporcionar suplementos de fitasa al animal o agregar fitasa al pienso. Los ejemplos de productos de fitasa disponibles comercialmente incluyen, entre otros: PHYZYME (Dupont, Danisco, Genencor); QUANTUM and FINASE (AB Vista, AB Enzymes); NATUPHOS (BASF); RONOZYME (DSM); Biofeed phytase (Novo Nordisk); Allzyme phytase (Alltech); OPTIPHOS (Enzyvia, Phytex, Cornell); Rovabio (Adisseo); PHYTOUT (US Waters). Cada uno de estos productos de fitasa tiene limitaciones al menos en niveles de producción, tiempo de producción, estabilidad a alta temperatura, estabilidad a bajo pH, actividad específica y requisitos de dosificación. Por lo tanto, existe una necesidad de una fitasa, por ejemplo, una fitasa que pueda producirse con rendimientos más altos en menos tiempo, una fitasa que retenga más actividad a altas temperaturas, una fitasa que retenga más actividad a pH bajo o una fitasa con niveles más altos actividad específica que permitirá a los usuarios reducir los niveles de dosificación y reducir el costo de producción y suministro de una fitasa para el pienso animal.

20 Una fitasa es una proteína que está codificada por una secuencia de ácidos nucleicos. La secuencia de ácidos nucleicos o ADN se clona en un organismo huésped, que es capaz de expresar o producir la fitasa. Hay una variedad de sistemas de expresión de proteínas conocidos en la técnica que pueden usarse para la producción de proteínas. Los ejemplos de sistemas de expresión de proteínas incluyen organismos tales como: bacterias, levaduras, mohos, mamíferos, plantas o insectos. Varios factores influyen en la selección de un sistema de expresión, tales como el tipo de proteína que se expresa y la cantidad de proteína que se produce. Demain, (2009) "Production of Recombinant Proteins by Microbes and higher Organisms," Biotechnology Advances, volumen 27, pp 297-306, describe varias ventajas y desventajas de una variedad de sistemas de expresión de proteínas.

25 La fitasa comercialmente se produce de manera extracelular a partir de una variedad de organismos huésped que incluyen, entre otros: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium funiculosum*, *Phytase canola (Brassica napus)*, *Pichia pastoris*, y *Schizosaccharomyces pombe*, ver Pariza, "Determining the safety of enzymes used in animal feed," Regulatory Toxicology and Pharmacology 56 (2010) 332-342.

30 El documento EP 1 659 173 A1 describe la producción de una fitasa a partir de *Aspergillus fumigatus* en la levadura metilotrófica *Hansenula polymorpha* en diferentes condiciones de cultivo.

35 La producción a escala industrial de una fitasa requiere un sistema de expresión que produzca los altos niveles de enzima en un corto período de tiempo a bajo costo. Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar un gen que cumpla o exceda los requisitos de producción para la fabricación a escala industrial de una fitasa.

40 Una modalidad es proporcionar un gen que codifica una fitasa que se produce a altos niveles en *Pseudomonas fluorescens*. El sistema de expresión podría ser cualquier sistema de expresión de *Pseudomonas fluorescens* conocido en la técnica, por ejemplo, el sistema de expresión de *Pseudomonas fluorescens* que está disponible comercialmente en Dow Global Technologies Inc., cepa DC454 (Patente de EE. UU. PUB. APP. NO. 20050130160 y la patente de EE.UU. PUB. APP. NO. 20050186666). Se inserta una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la enzima o polipéptido de fitasa en el vector pMYC (Dow Global Technologies Inc., Patente de EE. UU. PUB. APP. NO. 20050130160) o en el vector pDOW1169 (Dow Global Technologies Inc., patente de EE. UU. PUB. APP. NO. 20080058262) y luego se introduce en el huésped *Pseudomonas fluorescens* por electroporación. Los expertos en la técnica conocerán vectores alternativos que pueden usarse, además, como modalidades.

45 En otra modalidad, el ADN que codifica la fitasa puede introducirse, ya sea en un plásmido o transformarse de manera estable en el genoma de *Pseudomonas fluorescens*

50 En otra modalidad, el ADN que codifica la fitasa puede introducirse en un plásmido para dirigir su expresión. Los plásmidos que comprenden el ADN que codifica la fitasa pueden incluir, por ejemplo, vectores de expresión de *E. coli* de las familias pQE, pET y pASK; vectores de expresión de *Pseudomonas* de las familias pCN51 LT8, RSF1010, pWZ112T, y pMYC; vectores de expresión de *Bacillus* de las familias pBAX, pHT01 y pHIS1525; vectores de expresión de *Streptomyces* de las familias pIJ6021 y pIJ2460; y vectores de expresión de *Lactococcus* de las

familias pNZ9530 y pNZ8148, por ejemplo. Estos ejemplos tienen fines demostrativos y no representan un conjunto completo de vectores en los cuales puede expresarse la secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO:1.

- 5 En otra modalidad, se produce una secuencia de ácidos nucleicos aislada, recombinante o sintética que codifica una fitasa mediante expresión intracelular a un nivel de al menos 7,0 g/L, 8,0 g/L, 9,0 g/L, 10,0 g/L, 11,0 g/L, 12,0 g/L, 13,0 g/L, 14,0 g/L, 15,0 g/L, 16,0 g/L, 17,0 g/L, 18,0 g/L, 19,0 g/L, 20,0 g/L, 21,0 g/L, 22,0 g/L, 23,0 g/L, 24,0 g/L, 25,0 g/L, 26,0 g/L, 27,0 g/L, 28,0 g/L, 29,0 g/L, 30,0 g/L, 31,0 g/L, 32,0 g/L, 33,0 g/L, 34,0 g/L, 35,0 g/L, 36,0 g/L, 37,0 g/L, 38,0 g/L, 39,0 g/L, o al menos 40,0 g/L o más de 40,0 g/L.
- 10 En otra modalidad, el tiempo de producción de fermentación de la fitasa es inferior a 150 horas, 145 horas, 140 horas, 135 horas, 130 horas, 125 horas, 120 horas, 115 horas, 110 horas, 105 horas, 100 horas, 95 horas, 90 horas, 85 horas, 80 horas, 75 horas, 70 horas, 65 horas, 60 horas, 55 horas, 50 horas, 49 horas, 48 horas, 47 horas, 46 horas, 45 horas, 44 horas, 43 horas, 42 horas, 41 horas, 40 horas, 39 horas, 38 horas, 37 horas, 36 horas, 35 horas, 34 horas, 33 horas, 32 horas, 31 horas, 30 horas, 29 horas, 28 horas, 27 horas, 26 horas, 25 horas, 24 horas, 23 horas, 22 horas, 21 horas, 20 horas o menos de 20 horas.
- 15 En otra modalidad, la fermentación se realiza a un volumen igual o superior a 10 L, 100 L, 200 L, 500 L, 1000 L, 2000 L, 5000 L, 10 000 L, 25 000 L, 50 000 L, 55 000 L, 60 000 L, 65 000 L, 70 000 L, 75 000 L, 80 000 L, 85 000 L, 90 000 L, 95 000 L, 100 000 L, 110 000 L, 120 000 L, 130 000 L, 140 000 L, 150 000 L, 160 000 L, 170 000 L, 180 000 L, 190 000 L, 200 000 g/L o más de 200 000 L.
- 20 En una modalidad, el sistema de expresión intracelular es *Pseudomonas fluorescens*.
- 25 En una modalidad, el polipéptido que tiene actividad fitasa se produce a aproximadamente 35,0 g/L. En otra modalidad, el polipéptido que tiene actividad fitasa se produce a más de 7,0 g/L. En otra modalidad, la fitasa se expresará en menos de 144 horas. En otra modalidad, la fitasa se producirá en menos de 84 horas, 74 horas, 64 horas, 54 horas, 44 horas, 34 horas o 24 horas.
- 30 En una modalidad, el ácido nucleico que codifica la fitasa producida por expresión intracelular se deriva o es una versión modificada de un ácido nucleico derivado de *E. coli*, *Bacillus sp.*, *Hafnia sp.*, *Perni ophora lycii*, *Buttiauxella sp.*, *Citrobacter sp.*, o *Aspergillus niger*. En otra modalidad, la fitasa es cualquier fitasa descrita en las publicaciones PCT núms. WO 1999/008539, WO 2000/071728, WO 2001/090333, WO 2002/095003, WO 2006/028684, WO 2008/036916, o WO 2010/135588.
- 35 En otra modalidad, el ácido nucleico es un ácido nucleico aislado, sintético o recombinante. En otra modalidad, la secuencia de ácidos nucleicos aislado, recombinante o sintética codifica un polipéptido que tiene actividad fitasa. En una modalidad de la invención, la secuencia de ácidos nucleicos se selecciona del grupo que consiste en: una secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:5.
- 40 En otra modalidad de la invención, el ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad fitasa es una variante de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:5 en donde la variante es al menos 98,5 %, 98,6 %, 98,7 %, 98,8 %, 98,9 %, 99,0 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 %, o completamente (100 %) idéntica a SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, y/o SEQ ID NO:5, o un fragmento del mismo, en donde la variante codifica un polipéptido que tiene actividad fitasa.
- 45 En otra modalidad de la invención, la secuencia de ácidos nucleicos aislada, sintética o recombinante codifica un polipéptido seleccionado de un grupo que consiste en: SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:6. En otra modalidad de la invención, el ácido nucleico de SEQ ID NO:1, o una variante de SEQ ID NO:1 codifica un polipéptido de SEQ ID NO:3. En otra modalidad de la invención, el ácido nucleico de SEQ ID NO:2, o una variante de SEQ ID NO:2 codifica un polipéptido de SEQ ID NO:3. En otra modalidad de la invención, el ácido nucleico de SEQ ID NO:4, o una variante de SEQ ID NO:4 codifica un polipéptido de SEQ ID NO:6. En otra modalidad de la invención, el ácido nucleico de SEQ ID NO:5, o una variante de SEQ ID NO:5 codifica un polipéptido de SEQ ID NO:6. En una modalidad de la invención, una secuencia de ácidos nucleicos es complementaria a la secuencia de longitud completa de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, o una variante de estas.
- 50 En una modalidad de la invención, la fitasa es un polipéptido aislado, recombinante o sintético que tiene actividad fitasa, en donde el polipéptido se selecciona del grupo que consiste en: una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3, y SEQ ID NO:6.
- 55 En otra modalidad de la invención, la fitasa es una variante de SEQ ID NO:3, o SEQ ID NO:6, en donde la variante es al menos 98,9 %, 99,0 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 %, o completamente (100 %) idéntica a SEQ ID NO:3, o SEQ ID NO:6, o un fragmento enzimáticamente activo del mismo, en donde la variante tiene actividad fitasa. En otra modalidad de la invención, la fitasa es una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácidos nucleicos que comprende SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 y/o SEQ ID NO:5.
- 60
- 65

En una modalidad de la invención, la fitasa es una secuencia de aminoácidos que carece de una secuencia señal, una secuencia de proproteína, una secuencia promotora o cualquier combinación de las mismas.

5 En una modalidad de la invención, la fitasa es una secuencia de aminoácidos que comprende, además, una secuencia heteróloga seleccionada del grupo que consiste en: una secuencia señal, una etiqueta, un epítipo, un factor de apareamiento, una secuencia reguladora, una secuencia promotora, una extensión N-terminal, una extensión C-terminal y cualquier combinación de las mismas.

10 En una modalidad de la invención, la fitasa tiene una actividad específica en cualquier valor en un intervalo de aproximadamente 1000 U/mg hasta aproximadamente 1600 U/mg. En otra modalidad, la fitasa tiene una actividad específica de 1000 U/mg, 1100 U/mg, 1200 U/mg, 1300 U/mg, 1400 U/mg, 1500 U/mg, o 1600 U/mg.

15 En una modalidad de la invención, la fitasa es activa a cualquier pH que varía de aproximadamente pH 1,0 a aproximadamente pH 9,0. En una modalidad, la fitasa es activa a un pH de: 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, o condiciones más alcalinas.

20 En una modalidad de la invención, la fitasa es activa a cualquier temperatura en un intervalo de aproximadamente 50 grados C hasta aproximadamente 100 grados C. En otra modalidad, la fitasa es activa a una temperatura en el intervalo de más de 37 °C hasta aproximadamente 95 °C, o entre aproximadamente 55 °C hasta aproximadamente 85 °C, o entre aproximadamente 70 °C hasta aproximadamente 75 °C, o entre aproximadamente 70 °C hasta aproximadamente 95 °C, entre aproximadamente 90 °C hasta aproximadamente 95 °C, entre aproximadamente 95 °C hasta aproximadamente 105 °C, o entre aproximadamente 95 °C hasta aproximadamente 110 °C.

25 En una modalidad de la invención, se incluye una fitasa de la invención en una composición. En otra modalidad, la composición es una formulación. En otra modalidad de la invención, la composición es un alimento, un pienso, un suplemento, un aditivo para pienso animal o una ayuda dietética que comprende la fitasa. En otra modalidad de la invención, la composición es un producto farmacéutico que comprende la fitasa.

30 "Clonación", como se usa en la presente descripción, es un proceso para crear copias de fragmentos de ADN, células u organismos, en donde el ADN se introduce en un organismo huésped que produce copias del ADN recombinante.

35 "Vector de clonación", como se usa en la presente descripción, es un portador, tal como un plásmido bacteriano o bacteriófago, usado para insertar una secuencia genética, tal como un fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) o un gen completo, en una célula huésped de manera que el material genético extraño es capaz de replicarse.

40 "Cóctel" como se usa en la presente descripción es una composición que comprende la fitasa de esta invención en combinación con una o más enzimas adicionales. La una o más enzimas adicionales pueden ser cualquier enzima, por ejemplo, una lactasa, una lipasa, una proteasa, una catalasa, una xilanasas, una celulasa, una glucanasa, una mananasa, una amilasa, una amidasa, una epóxido hidrolasa, una esterasa, una fosfolipasa, una transaminasa, una amina oxidasa, una celobiohidrolasa, una amoníaco liasa o cualquier combinación de las mismas.

45 Un "codón" es una secuencia de tres polinucleótidos que especifica la identidad de un aminoácido para agregar a una proteína.

"ADN complementario o ADNc", como se usa en la presente descripción, es ADN sintetizado a partir de un molde de ARN mensajero (ARNm) en una reacción catalizada por la enzima transcriptasa inversa y la enzima ADN polimerasa.

50 "Cultivar", como se usa en la presente descripción, incluye el uso de un medio nutritivo convencional modificado según sea apropiado para activar promotores, seleccionar transformantes o amplificar genes en células huésped que contienen los polinucleótidos que codifican una fitasa. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las que se usan con la célula huésped seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el experto en la técnica.

55 "Célula huésped", como se usa en la presente descripción, es una célula transformada que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una fitasa de la invención. La célula huésped puede ser cualquiera de las células huésped conocidas por los expertos en la técnica, incluidas las células procariotas o células eucariotas, tales como células bacterianas, células fúngicas, células de levadura, células de mamíferos, células de insectos o células vegetales. La selección de un huésped apropiado está dentro de las capacidades de los expertos en la técnica.

60 Las células huésped pueden usarse de manera convencional para producir el producto génico codificado por la secuencia recombinante. En dependencia del huésped empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos producidos por las células huésped pueden estar glicosilados o no estar glicosilados. Los polipéptidos de la invención pueden incluir o no un residuo inicial de aminoácido de metionina.

"Idéntico", como se usa en la presente descripción, es la magnitud de la identidad de secuencia (homología), que puede determinarse mediante el uso de cualquier programa de computadora y parámetros asociados conocidos en la técnica, tales como BLAST 2.2.2. o FASTA versión 3.0t78, con los parámetros predeterminados.

5 Las identidades de secuencia de proteínas y/o ácidos nucleicos (homologías) pueden evaluarse mediante el uso de cualquiera de la variedad de algoritmos y programas de comparación de secuencias conocidos en la técnica. Dichos algoritmos y programas incluyen, entre otros, un programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool del National Center for Biological Information, tales como BLAST, BLAST2, BLASTN y BLASTX), TBLASTN, BLASTP, FASTA, TFasta, y CLUSTALW (Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85(8): 2444-2448, 1988; Altschul y otros, J. Mol. Biol. 215(3): 403-410, 1990; Thompson y otros, Nucleic Acids Res. 22(2): 4673-4680, 1994; Higgins y otros, Methods Enzymol. 266: 383-402, 1996; Altschul y otros, J. Mol. Biol. 215(3): 403-410, 1990; Altschul y otros, Nature Genetics 3:266-272, 1993. Los algoritmos BLAST, BLAST 2.0 y BLAST 2.2.2 se usan, además, para practicar la invención. Se describen, por ejemplo, en Altschul (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402; Altschul (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410. El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information.

Los términos "homología" e "identidad" en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias de polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje específico de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima sobre una ventana de comparación o región designada, medida con cualquier número de algoritmos de comparación de secuencias o mediante alineación manual e inspección visual. Para la comparación de secuencias, una secuencia puede actuar como una secuencia de referencia (una secuencia ilustrativa de la invención) con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se ingresan en una computadora, se designan las coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencia. Pueden usarse los parámetros predeterminados del programa o pueden designarse parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidades de secuencia para las secuencias de prueba en relación con la secuencia de referencia, en función de los parámetros del programa.

30 "Ácido nucleico", como se usa en la presente descripción, se refiere a un oligonucleótido, nucleótido, polinucleótido o a un fragmento de ácido nucleico de cualquiera de estos. El ácido nucleico puede ser ADN genómico, ADNc, ADN sintético o ARN (p. Ej., ARNm, ARNr, ARNt) de origen genómico o sintético que puede ser monocatenario o bicatenario y puede representar una cadena sentido o antisentido, hasta ácido nucleico peptídico (PNA), o hasta cualquier material similar al ADN o al ARN, de origen natural o sintético, incluidos, por ejemplo, ARNi, ribonucleoproteínas (por ejemplo, iRNP). El término abarca ácidos nucleicos, es decir, oligonucleótidos, que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales. El término abarca, además, estructuras similares a ácido nucleico con cadenas principales sintéticas, ver, por ejemplo, Mata (1997) Toxicol. Appl. Pharmacol. 144:189-197; Strauss-Soukup (1997) Biochemistry 36:8692-8698; Samstag (1996) Antisense Nucleic Acid Drug Dev 6:153-156.

40 Los ácidos nucleicos usados para practicar esta invención, ya sea ARN, ARNi, ácido nucleico antisentido, ADNc, ADN genómico, vectores, virus o híbridos de los mismos, pueden aislarse a partir de una variedad de fuentes, modificados por ingeniería genética, amplificados y/o expresados/generados de manera recombinante. Los polipéptidos recombinantes generados a partir de estos ácidos nucleicos pueden aislarse o clonarse individualmente y probarse para una actividad deseada. En una modalidad, los ácidos nucleicos pueden estar en un sistema de expresión recombinante, que incluye sistemas de expresión de células bacterianas, de mamíferos, de levadura, de insectos o vegetales.

Las técnicas para la manipulación de ácidos nucleicos, tales como, por ejemplo, subclonación, sondas de marcado (por ejemplo, marcado de cebador aleatorio mediante el uso de polimerasa de Klenow, traducción nick, amplificación), secuenciación, hibridación y similares se describen bien en la literatura científica y de patentes, ver, por ejemplo, Sambrook, ed., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (2ND ED.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Ausubel, ed. John Wiley & Sons, Inc., New York (1997); LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY: HYBRIDIZATION WITH NUCLEIC ACID PROBES, Part I. Theory and Nucleic Acid Preparation, Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993).

La descripción proporciona secuencias de ácido nucleico (por ejemplo, ADN) de la invención unidas operativamente a la (s) secuencia (s) de control de expresión (por ejemplo, transcripcional o traduccional), por ejemplo, promotores o potenciadores, para dirigir o modular la síntesis/expresión de ARN. La secuencia de control de expresión puede estar en un vector de expresión.

La descripción proporciona sistemas de expresión, por ejemplo, casetes de expresión, vectores, vehículos de clonación y similares, que comprenden ácidos nucleicos de la invención, por ejemplo, secuencias que codifican las fitas de la invención, para la expresión y sobreexpresión de los polipéptidos de la invención.

65

La expresión optimizada de las secuencias de ácido nucleico de la invención se refiere, además, a la mutagénesis dirigida o aleatoria de un ácido nucleico para efectuar una expresión aumentada de la proteína codificada. La mutagénesis de los ácidos nucleicos de la invención puede proporcionar directa o indirectamente un mayor rendimiento de proteína expresada. A modo de ejemplo no limitante, las técnicas de mutagénesis descritas en la presente descripción pueden usarse para efectuar la mutación de la región no traducida 5', la región no traducida 3' o la región codificante de un ácido nucleico, cuya mutación puede dar como resultado una mayor estabilidad al nivel del ARN o de la proteína, lo que resulta en un mayor rendimiento de proteína.

En algunas modalidades, las mutaciones a realizar en una proteína de interés están determinadas por diversos factores, incluido el análisis de la estructura bidimensional y tridimensional del extremo 5' prima de la estructura de ARNm predicha de un marco de lectura abierto (ORF) o gen de interés, así como los codones preferidos del huésped, para seleccionar mutaciones que pueden mejorar la expresión de la proteína de interés. Por ejemplo, en algunas modalidades, las mutaciones no se seleccionan únicamente en base a los codones preferidos del huésped, es decir, la optimización de codones, ni un programa de optimización de codones.

Una "mutación" es un cambio en una secuencia de nucleótidos o un aminoácido en comparación con una referencia.

Una "mutación silenciosa" es una mutación en un codón que no da como resultado la especificación de un aminoácido diferente.

Un "nucleótido" se refiere a una de las cuatro bases que comprenden la secuencia de ADN: Adenina (A), Timidina (T), Guanidina (G) y Citosina (C).

En un aspecto, los casetes de expresión de la descripción comprenden una secuencia de la invención y una secuencia de nucleótidos que es capaz de afectar la expresión de un gen estructural (es decir, una secuencia de codificación de proteínas, tal como una fitasa de la invención) en un huésped compatible con tales secuencias. Los casetes de expresión incluyen al menos un promotor unido operativamente con la secuencia que codifica el polipéptido; y, opcionalmente, con otras secuencias, por ejemplo, señales de terminación de la transcripción. Además, pueden usarse factores adicionales necesarios o útiles para efectuar la expresión, por ejemplo, potenciadores.

Los expertos en la técnica conocen un gran número de vectores adecuados y que están disponibles comercialmente. Los vectores ilustrativos incluyen: 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, puede usarse cualquier otro plásmido u otro vector siempre que sean replicables y viables en el huésped. Cuando se describe un microorganismo recombinante o un cultivo celular como que hospeda un "vector de expresión", esto incluye ADN circular y lineal extracromosómico y ADN que se ha incorporado en el(los) cromosoma(s) del huésped. Cuando una célula huésped mantiene un vector, el vector puede replicarse de manera estable por las células durante la mitosis como una estructura autónoma, o puede incorporarse dentro del genoma del huésped.

El vector de expresión puede comprender un promotor, un sitio de unión a ribosomas para el inicio de la traducción y un terminador de la transcripción. El vector puede incluir, además, secuencias apropiadas para amplificar la expresión.

La descripción proporciona pares de secuencias de cebadores de amplificación para amplificar ácidos nucleicos que codifican polipéptidos con una actividad fitasa, o subsecuencias de los mismos. Un experto en la técnica puede diseñar pares de secuencias de cebadores de amplificación para cualquier parte o la longitud total de estas secuencias. Además, los métodos de amplificación son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, reacción en cadena de polimerasa, PCR; amplificación de transcripción; replicación de secuencia autosostenida; amplificación de Q Beta replicasa; y otras técnicas mediadas por ARN polimerasa.

"Polipéptido", como se usa en la presente descripción, comprende "aminoácidos" o "secuencias de aminoácidos" que son oligopéptidos, péptidos, polipéptidos o secuencias de proteínas, o alternativamente, son fragmentos, porciones o subunidades de cualquiera de estos, y moléculas naturales o sintéticas.

En un aspecto, el polipéptido y los péptidos de la invención tienen actividad fitasa. En aspectos alternativos, ellos pueden, además, ser útiles como, por ejemplo, sondas de marcado, antígenos, tolerágenos, motivos, sitios activos de fitasa.

Los polipéptidos y péptidos de la invención pueden ser aislados, sintéticos o recombinantes. Los péptidos y las proteínas pueden expresarse de forma recombinante *in vitro* o *in vivo*. Los péptidos y polipéptidos de la invención pueden prepararse y aislarse mediante el uso de cualquier método conocido en la técnica. Los polipéptidos y péptidos de la invención pueden, además, sintetizarse total o parcialmente, mediante el uso de métodos químicos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los polipéptidos de fitasa pueden producirse en un sistema de expresión

recombinante estándar (como se describe en la presente descripción), sintetizarse químicamente o purificarse a partir de organismos en los que se expresan naturalmente.

5 En aspectos alternativos, los polipéptidos o proteínas "recombinantes" de la invención incluyen (se refieren a) polipéptidos o proteínas producidos por técnicas de ADN recombinante; por ejemplo, producidos a partir de células transformadas por un constructo de ADN exógeno que codifica el polipéptido o proteína deseado.

10 En aspectos alternativos, los péptidos y polipéptidos de la invención están glicosilados. La glicosilación puede añadirse después de la traducción, ya sea químicamente o mediante mecanismos biosintéticos celulares, en donde lo último incorpora el uso de motivos de glicosilación conocidos, que pueden ser nativos de la secuencia o pueden añadirse como un péptido o añadirse en la secuencia de codificación del ácido nucleico. La glicosilación puede estar unida por O o por N, o una combinación de los estos.

15 En aspectos alternativos, los péptidos y polipéptidos de la invención, como se definió anteriormente, comprenden formas "miméticas" y "peptidomiméticas", ya sea en parte o completamente. En un aspecto, los términos "mimético" y "peptidomimético" se refieren a un compuesto químico sintético que tiene sustancialmente las mismas características estructurales y/o funcionales de los polipéptidos de la invención. El mimético puede estar completamente compuesto de análogos sintéticos no naturales de aminoácidos, o es una molécula quimérica de aminoácidos peptídicos parcialmente naturales y análogos parcialmente no naturales de aminoácidos. El mimético puede incorporar, además, cualquier cantidad de sustituciones conservadoras de aminoácidos naturales siempre que dichas sustituciones no alteren sustancialmente la estructura y/o actividad del mimético. Al igual que con los polipéptidos de la invención que son variantes conservadoras, la experimentación de rutina determinará si un mimético está dentro del alcance de la invención, es decir, que su estructura y/o función no está sustancialmente alterada. Por lo tanto, en un aspecto, una composición mimética está dentro del alcance de la invención si tiene una actividad fitasa.

20 En aspectos alternativos, las sustituciones conservadoras son aquellas que sustituyen un aminoácido dado en un polipéptido por otro aminoácido de características similares. En aspectos alternativos, las sustituciones conservadoras son los siguientes reemplazos: reemplazos de un aminoácido alifático tal como Ala, Val, Leu e Ile con otro aminoácido alifático; reemplazo de un Ser con un Thr o viceversa; reemplazo de un residuo ácido tal como Asp y Glu con otro residuo ácido; reemplazo de un residuo que lleva un grupo amida, como Asn y Gln, con otro residuo que lleva un grupo amida; intercambio de un residuo básico como Lys y Arg con otro residuo básico; y reemplazo de un residuo aromático como Phe, Tyr con otro residuo aromático, sustitución de un aminoácido hidrófobo, como isoleucina, valina, leucina o metionina, por otro, o sustitución de un aminoácido polar por otro, como la sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico o glutamina por asparagina. En un aspecto, uno o más aminoácidos pueden eliminarse, por ejemplo, de un polipéptido de fitasa de la invención para dar como resultado la modificación de la estructura del polipéptido sin alterar significativamente su actividad biológica, o alternativamente, para alterar significativamente su actividad biológica a propósito. Por ejemplo, los aminoácidos amino o carboxilo terminales que se requieren, o alternativamente no se requieren, para la actividad biológica de fitasa pueden eliminarse y/o agregarse. Las secuencias de polipéptidos modificados de la invención pueden analizarse para determinar la actividad biológica de fitasa mediante cualquier número de métodos, que incluyen poner en contacto la secuencia de polipéptidos modificada con un sustrato de fitasa y determinar si el polipéptido modificado disminuye la cantidad de sustrato específico en el ensayo o aumenta los bioproductos de la reacción enzimática de un polipéptido de fitasa funcional con el sustrato.

45 En un aspecto, los péptidos y polipéptidos de la invención tienen secuencias de aminoácidos de secuencias "sustancialmente idénticas" de la invención, es decir, una secuencia que difiere en una o más sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras, 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 funcionales.

50 En una modalidad de la invención, la fitasa se selecciona de un grupo que consiste en: un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3 (codificada por un polinucleótido de SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2); y un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6 (codificada por un polinucleótido de SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:5).

60 En otra modalidad de la invención, la fitasa es una variante de polipéptido de SEQ ID NO:3, o SEQ ID NO:6, en donde la variante de polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 98,9 %, 99,0 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 %, o identidad completa (100 %) con el polipéptido de SEQ ID NO:3, o SEQ ID NO:6, o un fragmento enzimáticamente activo del mismo, en donde la variante de polipéptido tiene actividad fitasa.

65 La invención proporciona fitasas que tienen o no secuencias de señal modificadas (llamadas, además, péptidos de señal (SP) o péptidos líderes), o secuencias de señal heterólogas. Los polipéptidos de la invención pueden o no tener dominios modificados o heterólogos prepro y/o dominios catalíticos (CD). Los SP modificados o heterólogos, los dominios prepro y/o los CD incorporados en un polipéptido de la invención pueden ser parte de una proteína de

fusión, por ejemplo, como un dominio heterólogo en una proteína quimérica, o añadidos por un agente de enlace químico. Por ejemplo, una enzima de la invención puede comprender un dominio heterólogo SP y/o un dominio prepro en un vector, por ejemplo, un vector de serie pPIC (Life Technologies, Carlsbad, CA).

5 Adicionalmente, los polipéptidos de la invención pueden comprender, además, secuencias heterólogas, ya sean secuencias de otras fitasas, o de fuentes no fitasas, o secuencias completamente sintéticas. Así, en un aspecto, un ácido nucleico de la invención comprende la secuencia de codificación para una secuencia de señal (SP) endógena, modificada o heteróloga, dominio prepro y/o dominio catalítico (CD) y una secuencia heteróloga (es decir, una  
10 secuencia no asociada naturalmente con una secuencia señal (SP), dominio prepro y/o dominio catalítico (CD) de la descripción). La secuencia heteróloga puede estar en el extremo terminal 3', extremo terminal 5' y/o en ambos extremos de la secuencia de codificación SP, dominio prepro y/o CD.

La enzima inmovilizada y los soportes sólidos de la descripción son las enzimas fitasas, o fragmentos de las mismas, y los ácidos nucleicos que codifican las enzimas y los fragmentos pueden fijarse a un soporte sólido. Esto es a  
15 menudo económico y eficiente en el uso de las fitasas en procesos industriales. Por ejemplo, un consorcio o cóctel de enzimas fitasas (o fragmentos activos de las mismas), que se usan en una reacción química específica, puede unirse a un soporte sólido y remojar en un tanque de proceso. La reacción enzimática puede ocurrir. Luego, el soporte sólido puede sacarse del tanque, junto con las enzimas fijadas al mismo, para uso repetido. En una modalidad de la descripción, un ácido nucleico aislado de la invención se fija a un soporte sólido. En otra modalidad  
20 de la descripción, el soporte sólido se selecciona del grupo de un gel, una resina, un polímero, una cerámica, un vidrio, un microelectrodo y/o cualquier combinación de los estos.

Hay muchos métodos que un experto en la técnica conocerá para inmovilizar enzimas o fragmentos de las mismas, o ácidos nucleicos, sobre un soporte sólido. Algunos ejemplos de tales métodos incluyen, por ejemplo, generación  
25 electrostática de gotas, medios electroquímicos, por adsorción, por unión covalente, por reticulación, por reacción química o proceso, por encapsulación, por atrapamiento, por alginato de calcio, o por poli (2- hidroxietil metacrilato). Se describen métodos similares en *Methods in Enzymology, Immobilized Enzymes and Cells, Part C*. 1987. Academic Press. Editado por SP Colowick y NO Kaplan. Volumen 136; e *Immobilization of Enzymes and Cells*. 1997. Humana Press. Editado por GF Bickerstaff. Serie: *Methods in Biotechnology*, editado por JM Walker.

"Variante", como se usa en la presente descripción, incluye derivados o análogos de estos polipéptidos. En particular, las variantes pueden diferir en la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos de la invención, y secuencias sustancialmente idénticas a las mismas, en una o más sustituciones, adiciones, deleciones, fusiones y  
30 truncamientos, que pueden estar presentes en cualquier combinación.

Los métodos para generar variantes de los ácidos nucleicos de la invención, por ejemplo, los que codifican una enzima fitasa son bien conocidos en la técnica. Estos métodos pueden repetirse o usarse en diversas combinaciones para generar enzimas fitasa que tienen una actividad alterada o diferente o una estabilidad alterada o  
35 diferente de la de una fitasa codificada por el ácido nucleico molde. Estos métodos pueden, además, repetirse o usarse en varias combinaciones, por ejemplo, para generar variaciones en la expresión de genes/mensajes, traducción de mensajes o estabilidad de mensajes. En otro aspecto, la composición genética de una célula se altera, por ejemplo, mediante la modificación de un gen homólogo *ex vivo*, seguido de su reinserción en la célula.

La descripción proporciona, además, métodos para cambiar las características de una fitasa de la invención mediante mutagénesis y otros métodos, incluidos, por ejemplo, los enfoques patentados desarrollados por Verenum  
45 Corporation (anteriormente Diversa Corporation, San Diego, CA), por ejemplo, GeneReassembly (ver, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos núm. 6,537,776; Mutagénesis de Saturación del Sitio Génico (GSSM) (ver, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos núms. 6,171,820 y 6,764,835), Ensamblaje de genes mediado por exonucleasa en evolución dirigida (ver, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos núms. 6,361,974 y 6,352,842), Selección final en evolución dirigida (ver, por ejemplo, Patentes de EE. UU. núms. 6,358,709 y 6,238,884), Mezcla de síntesis basada en recombinación (ver, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. núms. 5,965,408 y 6,440,668, y Patente australiana núm. AU724521), Evolución dirigida de enzimas termofílicas (ver, por ejemplo, las patentes de EE. UU. núms. 5,830,696 y 6,335,179), y Ensamblaje combinatorio multisitio a la medida (ver, por ejemplo, el documento núm. WO 2009/018449).

Pueden usarse diversas técnicas conocidas en biología molecular, por ejemplo, mutagénesis aleatoria por PCR, ver, por ejemplo, Rice (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5467-5471; o, mutagénesis combinatoria de cassette múltiple, ver, por ejemplo, Cramer (1995) *Biotechniques* 18:194-196. Alternativamente, los ácidos nucleicos, por  
55 ejemplo, los genes, pueden volver a ensamblarse después de una fragmentación aleatoria o "estocástica", ver, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. núms. 6,291,242; 6,287,862; 6,287,861; 5,955,358; 5,830,721; 5,824,514; 5,811,238; 5,605,793. En aspectos alternativos, se introducen modificaciones, adiciones o deleciones por PCR propensa a errores, barajado, mutagénesis dirigida a oligonucleótidos, PCR de ensamblaje, mutagénesis por PCR sexual, mutagénesis in vivo, mutagénesis en casete, mutagénesis de conjunto recursivo, mutagénesis de conjunto exponencial, mutagénesis específica de sitio, reensamblaje de genes, mutagénesis de saturación del sitio genético (GSSM), reensamblaje de ligadura sintética (SLR), recombinación, recombinación de secuencia recursiva, mutagénesis de ADN modificada con fosfotoato, mutagénesis de molde que contiene uracilo, mutagénesis dúplex  
65

con fallas, mutagénesis de reparación con falta de coincidencia de puntos, mutagénesis de cepas huésped deficiente en reparación, mutagénesis química, mutagénesis radiogénica, mutagénesis por delección, mutagénesis de selección de restricción, mutagénesis de restricción-purificación, síntesis de genes artificiales, mutagénesis de conjunto, creación de multímeros de ácido nucleico quimérico y/o una combinación de estos y otros métodos.

"Plantas y semillas transgénicas", como se usa en la presente descripción, comprende un ácido nucleico, un polipéptido o una célula de la descripción transfectada o transformada. La descripción proporciona, además, productos vegetales, por ejemplo, aceites, semillas, hojas, extractos y similares, que comprenden un ácido nucleico y/o un polipéptido de la invención. La planta transgénica puede ser dicotiledónea (una dicot) o monocotiledónea (una monocot). La descripción proporciona, además, métodos para hacer y usar estas plantas y semillas transgénicas. La planta transgénica o la célula vegetal que expresa un polipéptido de la presente invención puede construirse de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica. Ver, por ejemplo, la Patente de EE. UU. núm. 6,309,872.

En algunas modalidades, para lograr la expresión extracelular de la fitasa, el constructo de expresión de la presente descripción usa una secuencia secretora señal. Aunque las secuencias de señal que son homólogas (nativas) a la especie vegetal huésped, las secuencias de señal heterólogas, es decir, aquellas que provienen de otras especies vegetales o de origen microbiano, pueden usarse igualmente, tales secuencias de señal son conocidas por los expertos en la técnica. Las secuencias de señal apropiadas que pueden usarse dentro del contexto de la presente descripción se describen en Blobel y otros, 1979; Von Heijne, 1986; García y otros, 1987; Sijmons y otros, 1990; Ng y otros, 1994; y Powers y otros, 1996).

Los "animales no humanos transgénicos" como se usan en la presente descripción, comprenden un ácido nucleico, un polipéptido, un casete o vector de expresión o una célula transfectada o transformada de la descripción. Los animales transgénicos no humanos pueden ser, por ejemplo, cabras, conejos, ovejas, cerdos, vacas, ratas y ratones, que comprenden los ácidos nucleicos de la invención. Estos animales pueden usarse, por ejemplo, como modelos *in vivo* para estudiar la actividad de fitasa o como modelos para detectar moduladores de la actividad de fitasa *in vivo*. Las secuencias de codificación para los polipéptidos que se expresarán en los animales transgénicos no humanos pueden diseñarse para ser constitutivas o, bajo el control de factores reguladores de la transcripción específicos de tejido, específicos del desarrollo o inducibles. Los animales transgénicos no humanos pueden diseñarse y generarse mediante el uso de cualquier método conocido en la técnica.

En una modalidad, una fitasa de la invención se usa como aditivo para pienso animal. Algunos de los beneficios de añadir fitasa incluyen, entre otros: aumentar el fósforo total contenido en el alimento, reducir el fósforo liberado al medio ambiente por excreción y aumentar la digestibilidad de otros minerales y aminoácidos.

En otra modalidad, un pienso para animales o un suplemento que comprende una fitasa de la invención puede administrarse a cualquier animal. La fitasa se incluye comúnmente en la alimentación animal para aves de corral, como pollos, pollos de engorde o gallinas ponedoras; pavos; patos; cerdos como puercos, lechones o cerdas; bovinos como el ganado vacuno; y alimentos de acuicultura para peces como trucha, salmón, tilapia, bagre y lubina.

En otra modalidad, un pienso para animales que comprende una fitasa de la invención puede proporcionarse a un animal en cualquier formulación conocida por los expertos en la técnica. Los ejemplos de formulaciones de alimentación animal incluyen, entre otros: una matriz de suministro, un gránulo, una tableta, un gel, un líquido, un aerosol, grano molido o un polvo.

En otra modalidad, una fitasa de la invención se usa para tratar individuos predispuestos a pérdida ósea, tales como osteoporosis, caquexia y tratamientos médicos, tales como quimioterapias, que pueden comprometer la absorción o el uso adecuado de nutrientes. Un aspecto de la invención es proporcionar una formulación farmacéutica o dietética que comprende una fitasa. Además, es común en la técnica usar una fitasa de esta invención para individuos que reciben entrenamiento atlético, entrenamiento físico intenso, dietas hospitalarias, dietas de cereales y legumbres pobres en micronutrientes, programas de almuerzos escolares o cualquier otro programa nutricional.

En una modalidad, una fitasa de la invención se usa en la producción industrial de biocombustibles y conversión de biomasa. Por ejemplo, la fitasa se usa en procesos de fermentación o producción de alcohol. En una modalidad, el alcohol es etanol, que puede ser para uso de combustible o es etanol potable. En una modalidad, el proceso de fermentación puede usar almidón o un material vegetal sin almidón, tal como un material lignocelulósico, tal como celulosa, hemicelulosa y/o lignina.

En otra modalidad, se usa una fitasa de la invención para tratar destiladores secos solubles (DDS); destiladores de granos secos (DDG); destiladores condensados solubles (CDS); destiladores de granos húmedos (DWG); y destiladores de granos secos con solubles (DDGS). Estos subproductos del proceso de fermentación de alcohol pueden usarse como ingrediente para pienso animal. En otra modalidad, la fitasa se usa para reducir la incrustación y aumentar el rendimiento de etanol.

En otra modalidad, una fitasa de la invención se usa para convertir algas, aceites vegetales vírgenes, aceites vegetales residuales, aguas residuales en combustible.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Actividad específica de fitasa

Se determinó la actividad específica (como se describe a continuación) para las fitasas expresadas en *Pseudomonas* y en *Pichia*. Las actividades específicas de las moléculas de fitasa no se afectaron por la expresión en los dos sistemas de expresión analizados (ver Fig. 1). Las células de *Pichia* se eliminaron del caldo de fermentación mediante centrifugación y el sobrenadante se trató con ADNsa y se intercambió el tampón con TRIS 100 mM, pH 8,0. Las células de *Pseudomonas* que expresan fitasa se lisaron mediante el uso de un microfluidizador y se centrifugaron. El sobrenadante se trató con ADNsa y se intercambió el tampón con Tris 100 mM, pH 8,0. Las muestras se cargaron luego en una columna de intercambio iónico (FPLC) y se recogieron fracciones. Se analizó la actividad de las fracciones eluidas y se corrió sobre SDS-PAGE; las fracciones puras se agruparon.

La concentración de proteína se determinó por espectrofotometría (absorbancia a 280 nm). El coeficiente específico de absorción de proteínas (280 nm) se determinó mediante el uso de la calculadora de software basada en péptidos, VECTOR NTI (Life Technologies, Carlsbad, CA). Se determinó que el coeficiente de 280 nm para las moléculas de fitasa basado en la secuencia de péptidos era  $OD_{280} 1,0 = 0,875 \text{ mg/mL}$  (SEQ ID NO:6 (codificado por SEQ ID NO:4), SEQ ID NO:6 (codificado por SEC ID NO:5), SEQ ID NO:3 (codificado por SEQ ID NO:1) y SEQ ID NO:3 (codificado por SEQ ID NO:2) y  $0,897 \text{ mg/mL}$  (SEQ ID NO:8, codificado por SEQ ID NO:7)). Se determinó que el ADN estaba por debajo de los valores medibles en función de las relaciones de absorbancia (260/280 nm).

La actividad específica de fitasa se determinó mediante el uso de un ensayo colorimétrico que detecta fosfato libre de la desfosforilación de ácido fítico. Se añadió una alícuota de 50  $\mu\text{L}$  de fitasa purificada a 950  $\mu\text{L}$  de una mezcla de sustrato precalentada (37 °C) de (fitato de dodecasodio 4 mM de acetato de sodio 100 mM pH 5,5). Se extrajeron alícuotas de 50  $\mu\text{L}$  cada minuto y se inactivó en 50  $\mu\text{L}$  de solución de parada/color (Molibdato-Vanadato). Después de 10 minutos, cuando el color amarillo se había desarrollado completamente, se usó un lector de absorbancia SpectraMax Plus para medir la  $OD_{415}$ . La actividad se determinó por los cálculos ilustrados a continuación.

$$\begin{aligned} \text{Actividad} &= \frac{\text{pendiente de la curva de reacción } (A_{415\text{nm}} \text{ min}^{-1}) \times \text{factor de dilución} \times 20}{\text{pendiente de la curva estándar de fosfato } (A_{415\text{nm}} \text{ } \mu\text{mol/mL Fosfato})} \\ &= \frac{\mu\text{mol/mL Fosfato}}{\text{min} \times \text{mL}} \\ &= \text{Unidades/mL} \\ \text{Actividad específica} &= \frac{\text{Unidades/mL}}{\text{Fitasa mg/mL}} \end{aligned}$$

Una unidad se define como el #  $\mu\text{moles}$  de fosfato liberados por minuto por la enzima

### Ejemplo 2: Actividad de la fitasa a alta temperatura (DSC $T_m$ )

Para determinar la termoestabilidad de las fitasas se empleó un calorímetro diferencial de barrido (DSC) Perkin-Elmer Pyris 1 para determinar las temperaturas de fusión ( $T_m$ ) de las variantes de la fitasa. El análisis de  $T_m$  se realizó a pH 5,5 (similar a un extracto de alimentación acuosa) mediante el uso de citrato 100 mM como tampón. Las corridas de DSC se corrieron con o sin 10 % de Sorbitol-10 % de NaCl. El análisis de DSC indica que el 10 % de Sorbitol-10 % de NaCl mejoró la termoestabilidad de las fitasas. En forma líquida, puede lograrse una  $T_m$  superior a 98 °C (Fig. 2). Las fitasas expresadas en *Pseudomonas* mostraron una  $T_m \sim 1\text{-}2$  °C más baja que las fitasas expresadas en *Pichia* en tampón solo, sin embargo, esta reducción de la temperatura no se observó cuando se añadió 10 % de sorbitol-10 % de NaCl (Fig. 3).

### Ejemplo 3: Perfil de pH

Los valores óptimos de pH de las fitasas, cuando se expresaron en *Pichia* o *Pseudomonas* (Fig. 4), se determinaron en pH 3,5 - pH 4,5. Las actividades de las fitasas en el sustrato fítico a diferentes puntos de pH se determinaron mediante el uso del tampón Britton-Robinson para eliminar las variables confusoras que resultan de cambiar los tampones para cubrir el rango probado de pH 1,0 - pH 5,5. Las actividades a diferentes pH se normalizaron al pH óptimo de 4.

### Ejemplo 4: Actividad de la fitasa en condiciones de pH bajo (fluido gástrico simulado (SGF)) y perfiles de pH

La estabilidad gástrica se evaluó mediante el tratamiento de las moléculas de fitasa en un fluido gástrico simulado (SGF) a pH 1,2 durante un transcurso de tiempo de 60 minutos. Se añadió pepsina al SGF a 10 unidades de pepsina por  $\mu\text{g}$  de fitasa. A los 10, 30 y 60 minutos, se extrajeron alícuotas de la mezcla de SGF-fitasa y se inactivó en tampón de carbonato de sodio 200 mM, pH 11,0. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE para determinar la magnitud de la digestión de proteínas. Los resultados de SDS-PAGE (Fig. 5) demostraron que la banda de fitasa

para la molécula de SEQ ID NO:8 (codificada por SEQ ID NO:7) se degrada en 10 minutos de tratamiento con SGF+ pepsina. Las otras moléculas de fitasa expresadas en *Pichia* (SEQ ID NO:3 (codificada por SEQ ID NO:2) y SEQ ID NO:6 (codificada por SEQ ID NO:5)) y *Pseudomonas* (SEQ ID NO:3 (codificada por SEQ ID NO:1) y SEQ ID NO:6 (codificada por SEQ ID NO:4)) muestran una degradación mínima después de 60 minutos.

5 Según informes anteriores, la aplicación de *E. coli wt appA* fitasa demostró una vida media de SGF de 2,4 minutos (Garrett y otros, 2004). La fitasa de SEQ ID NO:8 (codificada por SEQ ID NO:7) prácticamente no tiene actividad después de 10 minutos y las otras fitasas (SEQ ID NO:3 (codificada por SEQ ID NO:2), SEQ ID NO:6 (codificada por SEQ ID NO:5), SEQ ID NO:3 (codificada por SEQ ID NO:1) y SEQ ID NO:6 (codificada por SEQ ID NO:4))  
10 mantienen una proteína intacta (Fig. 5) y actividad después de 60 minutos (Fig. 6).

Ejemplo 5: Expresión de fitasa

15 El sistema de expresión de *Pichia* utiliza la cepa *Pichia pastoris* GS115 y el promotor inducible por metanol (AOX) con licencia de RCT. La fitasa se secreta en el caldo de fermentación. La fitasa de SEQ ID NO:3 (codificada por SEQ ID NO:2) expresada en *Pichia* se probó en fermentadores de 30L y alcanzó 7,0 g/L después de 120 h. Los resultados de la fermentación de la fitasa SEQ ID NO:6 (codificada por SEQ ID NO:5) fueron inferiores a 7,0 g/L.

20 El sistema de expresión de *Pseudomonas* de DOW utiliza la cepa (DC454) con la secuencia de fitasa insertada en el pDOW1169 (inducible por IPTG). La fitasa se expresa intracelularmente y, por lo tanto, requiere lisis celular para la recuperación de fitasa (ver Figura 7). Los resultados, por triplicado, para la expresión intracelular de fitasa (SEQ ID NO:3 (codificada por SEQ ID NO:1) y SEQ ID NO:6 (codificada por SEQ ID NO:4)) en *Pseudomonas* varían de aproximadamente 5 g/L hasta aproximadamente 35,0 g/L.

25 Listado de secuencias

<110> VERENIUM CORPORATION

<120> Fitasa

30 <130> VEREN.067WO/D2500-1WO

<140> Presentado en la presente

35 <141> Presentado en la presente

<150> US 61/777,139

<151> 2013-03-12

<150> GB 1308828.1

40 <151> 2013-05-16

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.5

45 <210> 1

<211> 1239

<212> ADN

50 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polinucleótido generado sintéticamente

<400> 1

55

60

ES 2 806 748 T3

5 atgcagagcg agccggagct gaagctggaag agcgtggtga ttgtcagccg tcatggtgtg 60  
 cgtgctccaa ccaaggctac gcaactgatg caggatgtca cccagacgc atggccaacc 120  
 tggccggtaa aactgggtga gctgacaccg cgcggtggtg agctaacgc ctatctcgga 180  
 10 cactactggc gtcagcgtct ggtagccgac ggattgctgc ctaaagaagg ctgcccgcag 240  
 tctggtcagc tcgcgattat tgctgatgtc gacgagcgtc cccgtaaaac aggcgaagcc 300  
 ttcgcccgcg ggctggcacc tgactgtgca ataaccgtac atcatcaggc agatacgtcc 360  
 15 agtcccgatc cgttatttaa tcctctaaaa actggcgttt gccaaactgga tgtcgcgaac 420  
 gtgagacggg cgatcctcag aaggcagga gggcaattg ctgactttac ccggcattat 480  
 caaacggcgt ttcgcgaact ggaacgggtg cttaatcttc cgcaatcaaa cttgtgcctt 540  
 aaacgtgaga aacaggacga aagctgttca ttaacgcagg cattaccatc ggaactcaag 600  
 20 gtgagcgcgc acgatgtctc attaacgggt gcggttagcc tcgcatcaat gctgacggag 660  
 atatttctcc tgcaacaagc acagggaatg ccggagccgg ggtggggaag gatcaccgat 720  
 tcacaccagt ggaacacctt gctaagtttg cataacgcgg tgtttgattt gctacaacgc 780  
 25 acgccagagg ttgcccgcag ccgcgccacc ccgttattag atttgatcaa gacagcgttg 840  
 acgccccatc caccgcaaaa acaggcgtat ggtgtgacat taccacttc agtctgtttt 900  
 atcgcgggac acgatactaa tctggcaaat ctggcggcg cactggagct caactggacg 960  
 cttcccggtc agccggataa ctatccgcca ggtggtgaac tgggtgttga acgctggcgt 1020  
 30 cggctaagcg ataacagcca gtggattcag gtttcgctgg tcttccagac ttacagcag 1080  
 atgcgtgata aaacgcccgt gtcattaaat acgcccggc gagaggtgaa actgaccctg 1140  
 gcaggatgtg aagagcgaag tcgacagggc atgtgttcgt tggcagggtt tacgcaaatc 1200  
 35 gtgaatgaag cacgcatacc ggctgacgt ttgtgatga 1239

40 <210> 2  
 <211> 1230  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>  
 <223> Polinucleótido generado sintéticamente

<400> 2

50

55

ES 2 806 748 T3

5 cagagtgagc cggagctgaa gctggaaagt gtggtgattg tcagtcgtca tgggtgtgctg 60  
gctccaacca aggctacgca actgatgcag gatgtcacc cagacgcatg gccaacctgg 120  
cgggtaaaac tgggtgagct gacaccgcbc ggtggtgagc taatcgcta tctcggacat 180  
10 tactggcgtc agcgtctggt agccgacgga ttgctgccta aagaaggctg cccgcagtct 240  
ggtcaggctc cgattattgc tgatgtcgac gagcgtaccc gtaaaacagg cgaagccttc 300  
gccgccgggc tggcacctga ctgtgcaata accgtacatc atcaggcaga tacgtccagt 360  
cccgatccgt tatttaatcc tctaaaaact ggcgtttgcc aactggatgt cgcgaacgtg 420  
15 agacgggcca tcctcagaag ggcaggaggg tcaattgctg actttaccg gcattatcaa 480  
acggcgtttc gcgaactgga acgggtgctt aattttccgc aatcaaactt gtgccttaaa 540  
cgtgagaaac aggacgaaag ctgttcatta acgcaggcat taccatcgga actcaaggctg 600  
20 agcgcgcgac atgtctcatt aaccggtgcg gttagcctcg catcaatgct gacggagata 660  
tttctcctgc aacaagcaca gggaaatgcc gagccgggtg ggggaaggat caccgattca 720  
caccagtgga acaccttgct aagtttgcat aacgcggtgt ttgatttgct acaacgcacg 780  
25 ccagaggttg cccgcagccg cgccacccc ttattagatt tgatcaagac agcgttgacg 840  
ccccatccac cgcaaaaaca ggcgtatggt gtgacattac ccacttcagt gctgtttatc 900  
gccggacacg atactaatct ggcaaatctc ggcggcgcac tggagctcaa ctggacgctt 960  
cccggtcagc cggataacta tccgccaggt ggtgaactgg tgtttgaacg ctggcgtcgg 1020  
30 ctaagcgata acagccagtg gattcagggt tcgctggtct tccagacttt acagcagatg 1080  
cgtgataaaa cgccgctgct attaaatagc ccgcccggag aggtgaaact gaccctggca 1140  
ggatgtgaag agcgaatgc gcaggcatg tgttcgttg caggttttac gcaaatcgtg 1200  
35 aatgaagcac gcataccggc gtgcagtttg 1230

<210> 3

<211> 411

<212> PRT

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polinucleótido generado sintéticamente

45 <400> 3

50

55

ES 2 806 748 T3

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

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

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

15 Thr Pro Arg Gly Gly Glu Leu Ile Ala Tyr Leu Gly His Tyr Trp Arg  
 50 55 60

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

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

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

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

30 Leu Lys Thr Gly Val Cys Gln Leu Asp Val Ala Asn Val Arg Arg Ala  
 130 135 140

Ile Leu Arg Arg Ala Gly Gly Ser Ile Ala Asp Phe Thr Arg His Tyr  
 145 150 155 160

35 Gln Thr Ala Phe Arg Glu Leu Glu Arg Val Leu Asn Phe Pro Gln Ser  
 165 170 175

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

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

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

50

ES 2 806 748 T3

5 Gln Gln Ala Gln Gly Met Pro Glu Pro Gly Trp Gly Arg Ile Thr Asp  
 225 230 235 240

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

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

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

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

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

Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Tyr Pro Pro Gly Gly Glu Leu Val Phe  
 325 330 335

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

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

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

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

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

40 <210> 4  
 <211> 1266  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>  
 <223> Polinucleótido generado sintéticamente

<400> 4

50 atgcagagcg agccggagct gaagctggaa agcgtggtga ttgtcagtcg tcatggtgtg 60  
 cgtgctccaa ccaaggctac gcaactgatg caggatgtca cccagacgc atggccaacc 120

55

ES 2 806 748 T3

5	tggccggtaa aactgggtga gctgacaccg cgcggtggtg agctaatacgc ctatctcgga	180
	cattactggc gtcagcgtct ggtagccgac ggattgctgc ctaaagaagg ctgcccgcag	240
	tctggtcagg tcgcgattat tgctgatgtc gacgagcgtc cccgtaaaac aggcgaagcc	300
10	ttcgccgccg ggctggcacc tgactgtgca ataaccgtac atcatcaggc agatacgtcc	360
	agtcccgatc cgttatthaa tcctctaaaa actggcgttt gccaaactgga tgtcgcgaac	420
	gtgactcggg cgatcctcag aagggcagga ggggtcaattg ctgactttac ccggcattat	480
15	caaacggcgt ttcgcgaact ggaacgggtg ctttaattttc cgcaatcaaa cttgtgcctt	540
	aaacgtgaga aacaggacga aagctgttca ttaacgcagg cattaccatc ggaactcaag	600
	gtgagcggcc acgatgtctc attaaccggt gcggttagcc tcgcatcaat gctgacggag	660
	atatttctcc tgcaacaagc acagggaatg ccggagccgg ggtggggaag gatcaccgat	720
20	tcacaccagt ggaacacctt gctaagtttg cataacgcgg tgtttgattt gctacaacgc	780
	acgccagagg ttgcccgcag ccgcgccacc ccgttattag atttgatcaa gacagcgttg	840
	acgccccatc caccgcaaaa acaggcgat ggtgtgacat taccacttc agtgctgttt	900
25	atcgccggac acgatactaa tctggcaaat ctcgcgcgcg cactggagct caactggacg	960
	cttcccggtc agccggataa ctatccgcca ggtggtgaac tgggtgttga acgctggcgt	1020
	cggtctaacg ataacagcca gtggattcag gtttcgctgg tcttccagac tttacagcag	1080
	atgctgata aaacgcgct gtcattaaat acgccgcccg gagaggtgaa actgaccctg	1140
30	gcaggatgtg aagagcgaaa tgcgcagggc atgtgttcgt tggcaggttt tacgcaaatc	1200
	gtgaatgaag cacgcatacc ggcgtgcagt ttgtgatgac tcgagcccaa aacgaaaggc	1260
	tcagtc	1266
35	<210> 5	
	<211> 1230	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Polinucleótido generado sintéticamente	
	<400> 5	
45	cagagtgagc cggagctgaa gctggaaagt gtggtgattg tcagtcgtca tgggtgtgct	60
	gctccaacca aggctacgca actgatgcag gatgtcacc cagacgcatt gccaacctgg	120
	ccggtaaaac tgggtgagct gacaccgcgc ggtggtgagc taatcgcta tctcggacat	180
50	tactggcgtc agcgtctggt agccgacgga ttgctgccta aagaaggctg cccgcagtct	240
	ggtcaggctc cgattattgc tgatgtcgac gagcgtaccc gtaaaacagg cgaagccttc	300
	gccgcccggc tggcacctga ctgtgcaata accgtacatc atcaggcaga tacgtccagt	360
55	cccgatccgt tatttaaatcc tctaaaaact ggcgtttgcc aactggatgt cgcgaacgtg	420

ES 2 806 748 T3

5 actcgggcga tcctcagaag ggcaggaggg tcaattgctg actttacccg gcattatcaa 480  
 acggcgtttc gcgaactgga acgggtgctt aattttccgc aatcaaactt gtgccttaaa 540  
 cgtgagaaac aggacgaaag ctgttcatta acgcaggcat taccatcgga actcaagggtg 600  
 10 agcggccgacg atgtctcatt aaccgggtgog gttagcctcg catcaatgct gacggagata 660  
 tttctcctgc aacaagcaca gggaatgccg gagccgggggt ggggaaggat caccgattca 720  
 caccagtgga acaccttgct aagtttgcatt aacgcgggtg ttgatttgcct acaacgcacg 780  
 ccagagggtg cccgcagccg cggcaccocg ttattagatt tgatcaagac agcgttgacg 840  
 15 ccccatccac cgcaaaaaca ggcgtatggt gtgacattac ccacttcagt gctgtttatc 900  
 gccggacacg atactaatct ggcaaatctc ggcggcgcac tggagctcaa ctggacgctt 960  
 cccggtcagc cggataacta tccgccaggt ggtgaactgg tgtttgaacg ctggcgctcg 1020  
 20 ctaagcgata acagccagtg gattcaggtt tcgctggtct tccagacttt acagcagatg 1080  
 cgtgataaaa gcgcgctgct attaaatagc ccgccggag aggtgaaact gaccctggca 1140  
 ggatgtgaag agcgaaatgc gcagggcatg tgttcggttg caggttttac gcaaactgctg 1200  
 25 aatgaagcac gcataccggc gtgcagtttg 1230

<210> 6  
 <211> 411  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Polinucleótido generado sintéticamente

35 <400> 6

	Met	Gln	Ser	Glu	Pro	Glu	Leu	Lys	Leu	Glu	Ser	Val	Val	Ile	Val	Ser
	1				5					10					15	
40	Arg	His	Gly	Val	Arg	Ala	Pro	Thr	Lys	Ala	Thr	Gln	Leu	Met	Gln	Asp
				20					25					30		
	Val	Thr	Pro	Asp	Ala	Trp	Pro	Thr	Trp	Pro	Val	Lys	Leu	Gly	Glu	Leu
			35					40					45			
45	Thr	Pro	Arg	Gly	Gly	Glu	Leu	Ile	Ala	Tyr	Leu	Gly	His	Tyr	Trp	Arg
	50						55					60				
50	Gln	Arg	Leu	Val	Ala	Asp	Gly	Leu	Leu	Pro	Lys	Glu	Gly	Cys	Pro	Gln
	65					70					75					80
	Ser	Gly	Gln	Val	Ala	Ile	Ile	Ala	Asp	Val	Asp	Glu	Arg	Thr	Arg	Lys
					85					90						95

55

ES 2 806 748 T3

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

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

10 Leu Lys Thr Gly Val Cys Gln Leu Asp Val Ala Asn Val Thr Arg Ala  
130 135 140

15 Ile Leu Arg Arg Ala Gly Gly Ser Ile Ala Asp Phe Thr Arg His Tyr  
145 150 155 160

Gln Thr Ala Phe Arg Glu Leu Glu Arg Val Leu Asn Phe Pro Gln Ser  
165 170 175

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

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

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

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

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

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

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

40 Ala Tyr Gly Val Thr Leu Pro Thr Ser Val Leu Phe Ile Ala Gly His  
290 295 300

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

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

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

50

ES 2 806 748 T3

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

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

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

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

<210> 7  
 <211> 1230  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Polinucleótido generado sintéticamente

25 <400> 7

cagagtgagc cggagctgaa gctggaaagt gtgggtgattg tcagtcgtca tgggtgtcgt 60

gctccaacca aggccatgca actgatgcag gatgtcacc cagacgcatg gccaacctgg 120

30 ccggtaaaac tgggtgagct gacaccgcgc ggtggtgagc taatcgccca tctcggacat 180

tactggcgtc agcgtctggt agccgacgga ttgctgccta aatgtggctg cccgcagtct 240

ggtcaggtcg cgattattgc tgatgtcgac gagcgtaccc gtaaaacagg cgaagccttc 300

35 gccgccgggc tggcacctga ctgtgcaata accgtacata cccaggcaga tacgtccagt 360

cccgatccgt tatttaatcc tctaaaaact ggcgtttgcc aactggatgt ggcgaacgtg 420

agacgtgcga tcctcgagag ggcaggagg tcaattgctg actttaccgg gcattatcaa 480

acggcgtttc gcgaaactgga acgggtgctt aatthtccgc aatcaaactt gtgccttaaa 540

40 cgtgagaaac aggacgaaag ctgttcatta acgcaggcat taccatcgga actcaaggtg 600

agcggcact gtgtctcatt aaccgggtgcg gtaagcctcg catcaatgct gacggagata 660

tttctcctgc aacatgcaca ggaatgccg gagccgggtt ggggaaggat caccgattca 720

45 caccagtgga acaccttgct aagtttgcatt aacgcggtgt ttgatttgct acaacgcacg 780

ccagaggttg cccgcagccg cgccaccccg ttattagatt tgatcaagac agcgttgacg 840

ccccatccac cgcaaaaaca ggcgtatggt gtgacattac ccacttcagt gctgtttacc 900

50 gccggacacg atactaatct ggcaaatctc ggcggcgcac tggagctcga atggacgctt 960

cccggtcagc cggataacta tccgccaggt ggtgaactgg tgtttgaacg ctggcgtcgg 1020

ctaagcgata acagccagtg gattcaggtt tcgctggtct tccagacttt acagcagatg 1080

cgtgataaaa cgccgctgct attaaatcgc ccgcccggag aggtgaaact gaccctggca 1140

55 ggatgtgaag agcgaatgc gcaggcatg tgttcgttgg caggttttac gcaaatcgtg 1200

aatgaagcac gcataccggc gtgcagtttg 1230

ES 2 806 748 T3

5 <210> 8  
 <211> 411  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> Polinucleótido generado sintéticamente

<400> 8

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

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

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

Thr Pro Arg Gly Gly Glu Leu Ile Ala His Leu Gly His Tyr Trp Arg  
 50 55 60

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

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

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

35 Val His Thr Gln Ala Asp Thr Ser Ser Pro Asp Pro Leu Phe Asn Pro  
 115 120 125

40 Leu Lys Thr Gly Val Cys Gln Leu Asp Val Ala Asn Val Arg Arg Ala  
 130 135 140

Ile Leu Glu Arg Ala Gly Gly Ser Ile Ala Asp Phe Thr Gly His Tyr  
 145 150 155 160

45 Gln Thr Ala Phe Arg Glu Leu Glu Arg Val Leu Asn Phe Pro Gln Ser  
 165 170 175

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

50

55

ES 2 806 748 T3

5

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

10

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

Gln His Ala Gln Gly Met Pro Glu Pro Gly Trp Gly Arg Ile Thr Asp  
 225 230 235 240

15

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

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

20

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

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

25

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

30

Leu Pro Gly Gln Pro Asp Asn Tyr Pro Pro Gly Gly Glu Leu Val Phe  
 325 330 335

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

35

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

40

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

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

45

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

## REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico aislado, recombinante o sintético que codifica un polipéptido que tiene actividad fitasa, en donde el ácido nucleico se selecciona del grupo que consiste en:
- 5
- (a) un ácido nucleico que comprende la secuencia de SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, o SEQ ID NO:5;
- (b) una variante de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:5, en donde la variante comprende una secuencia que tiene al menos 98,5 %, 98,6 %, 98,7 %, 98,8 %, 98,9 %, 99,0 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 %, de identidad con la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, o SEQ ID NO:5, y en donde la variante codifica un polipéptido que tiene actividad fitasa;
- 10
- (c) un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:6;
- (d) un fragmento de ácido nucleico de (a), (b) o (c), en donde el fragmento codifica un polipéptido que tiene actividad fitasa; y
- 15
- (e) un ácido nucleico complementario a la secuencia de longitud completa de (a), (b), (c) o (d).
2. Un polipéptido aislado, recombinante o sintético que tiene actividad fitasa, en donde el polipéptido se selecciona del grupo que consiste en:
- 20
- (a) una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de SEQ ID NO:3, o SEQ ID NO:6;
- (b) una variante de SEQ ID NO:3, en donde la variante comprende una secuencia que tiene al menos 98,9 %, 99,0 %, 99,1 %, 99,2 %, 99,3 %, 99,4 %, 99,5 %, 99,6 %, 99,7 %, 99,8 %, 99,9 %, de identidad con la SEQ ID NO:3, o SEQ ID NO:6 y en donde la variante tiene actividad fitasa;
- 25
- (c) una secuencia de aminoácidos codificada por un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:5; y
- (d) una secuencia de aminoácidos que comprende un fragmento de SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:6, en donde el fragmento tiene actividad fitasa.
- 30
3. El polipéptido aislado, recombinante o sintético de la reivindicación 2, en donde el polipéptido
- (a) no comprende una secuencia señal, una secuencia de proproteína, una secuencia promotora o cualquier combinación de las mismas, o
- 35
- (b) comprende además una secuencia heteróloga seleccionada del grupo que consiste en: una secuencia señal, una etiqueta, un epítipo, una secuencia promotora, una extensión N-terminal, una extensión C-terminal y cualquier combinación de las mismas.
4. El polipéptido aislado, recombinante o sintético de la reivindicación 2, en donde el polipéptido
- 40
- (a) comprende además al menos una segunda enzima, o
- (b) el polipéptido de (a), en donde la segunda enzima se selecciona del grupo que consiste en: una lactasa, una lipasa, una proteasa, una catalasa, una xilanasasa, una celulasa, una glucanasa, una mananasa, una amilasa, una amidasa, una epóxido hidrolasa, una esterasa, fosfolipasa, transaminasa, una amina oxidasa, celobiohidrolasa, una amoníaco liasa y cualquier combinación de las mismas.
- 45
5. El polipéptido aislado, recombinante o sintético de la reivindicación 2, en donde la fitasa:
- (a) tiene una actividad específica de aproximadamente 1000 U/mg a 1600 U/mg,
- 50
- (b) es activa a un pH de al menos pH 1,0 hasta aproximadamente pH 9,0, o
- (c) es activa a una temperatura de aproximadamente 50 grados C a aproximadamente 100 grados C.
6. Un polipéptido aislado, recombinante o sintético que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de un grupo que consiste en: SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:6.
- 55
7. Un ácido nucleico aislado, recombinante o sintético que comprende
- (a) una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada de un grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:5, en donde la secuencia de ácidos nucleicos codifica un polipéptido que tiene una actividad fitasa, o
- 60
- (b) una secuencia de ácidos nucleicos que comprende la SEQ ID NO:1, en donde la secuencia de ácidos nucleicos codifica un polipéptido que tiene una actividad fitasa y que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3.
- 65
8. Una composición que comprende el polipéptido aislado, recombinante o sintético de la reivindicación 2.

9. La composición de la reivindicación 8, en donde la composición es

- (a) un alimento o un pienso,
- (b) un aditivo para el alimento, un aditivo para piensos o un suplemento dietético, o
- (c) un producto farmacéutico.

5

Figura 1

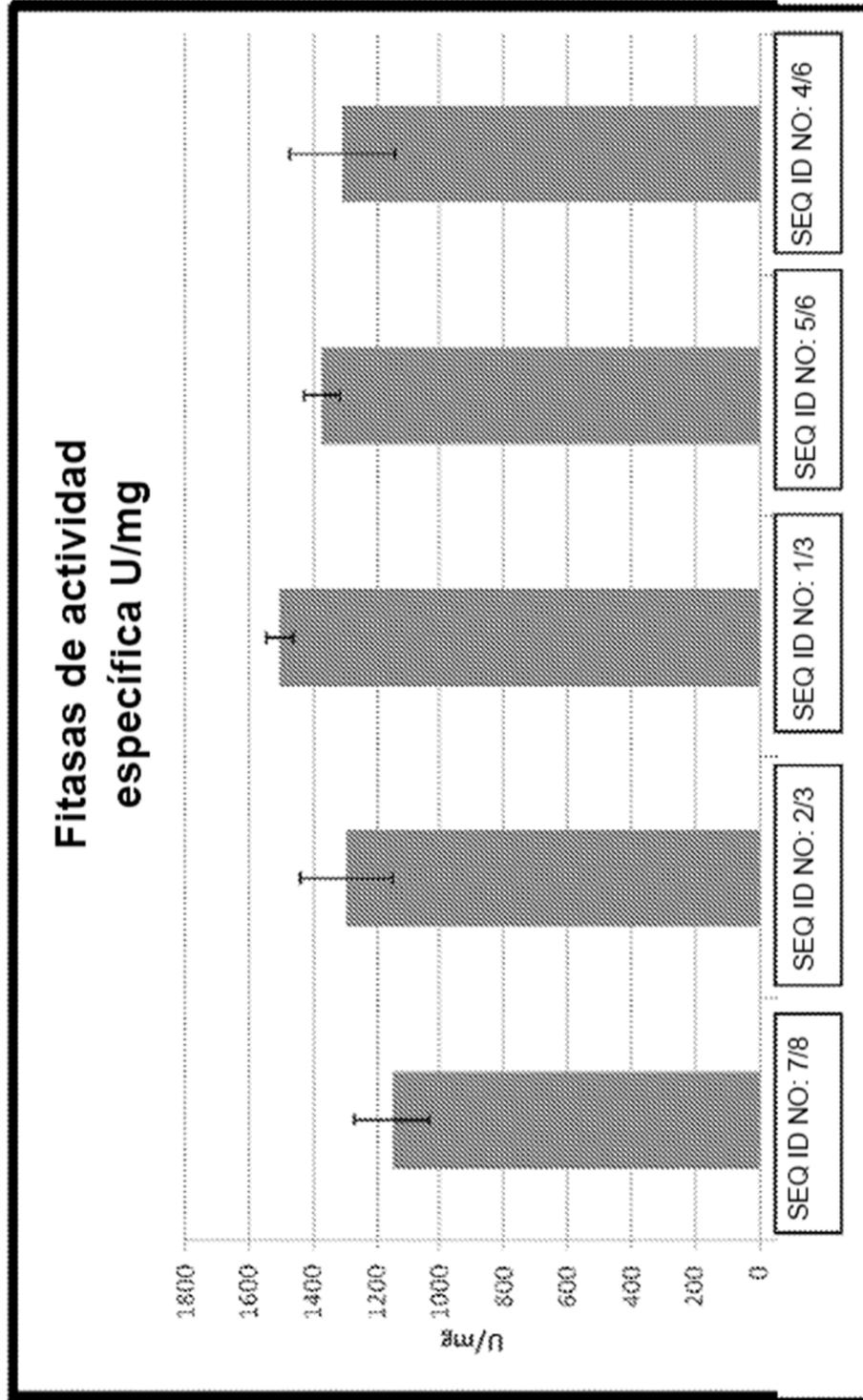


Figura 2

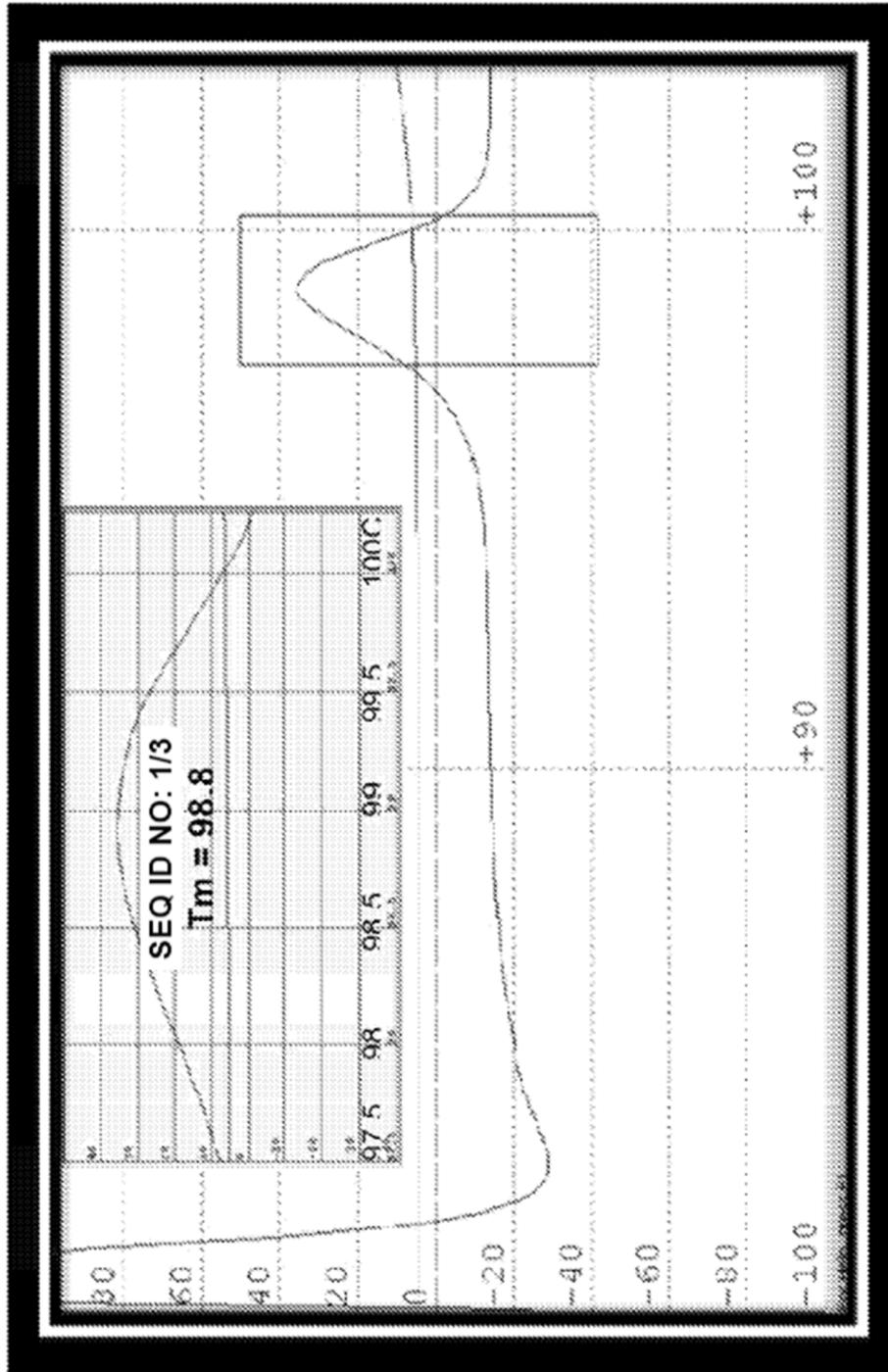


FIGURA 3

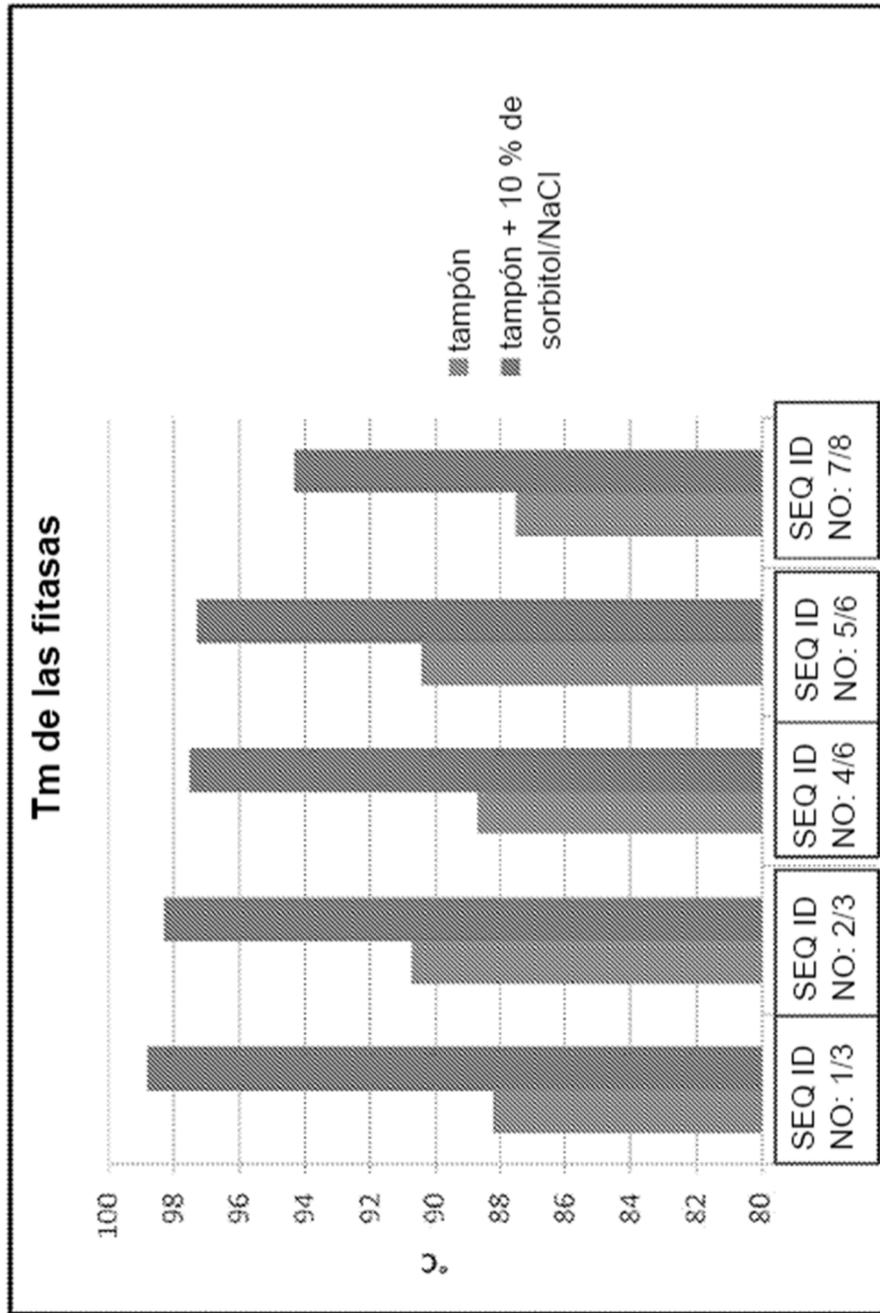


FIGURA 4

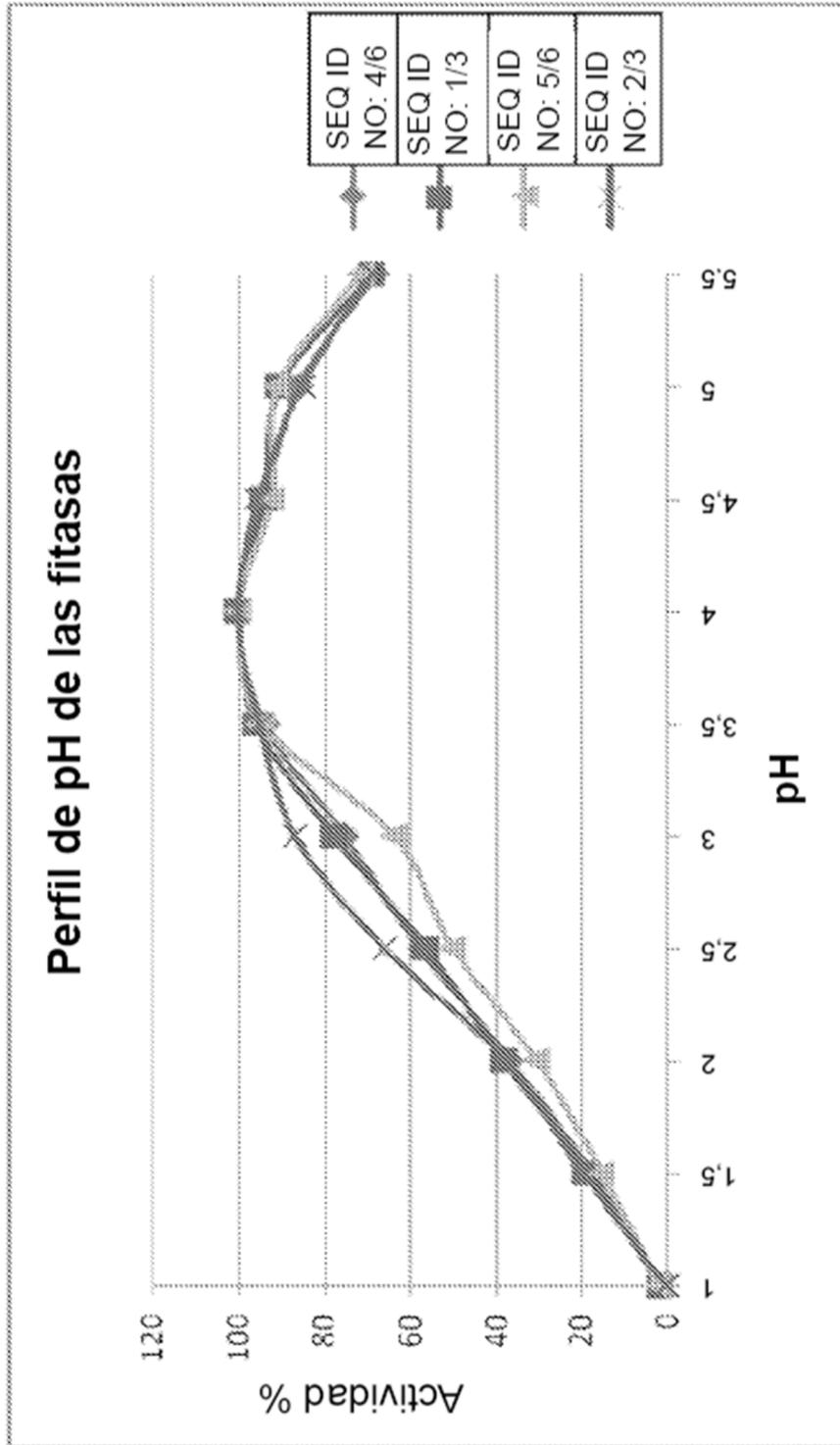


Figura 5

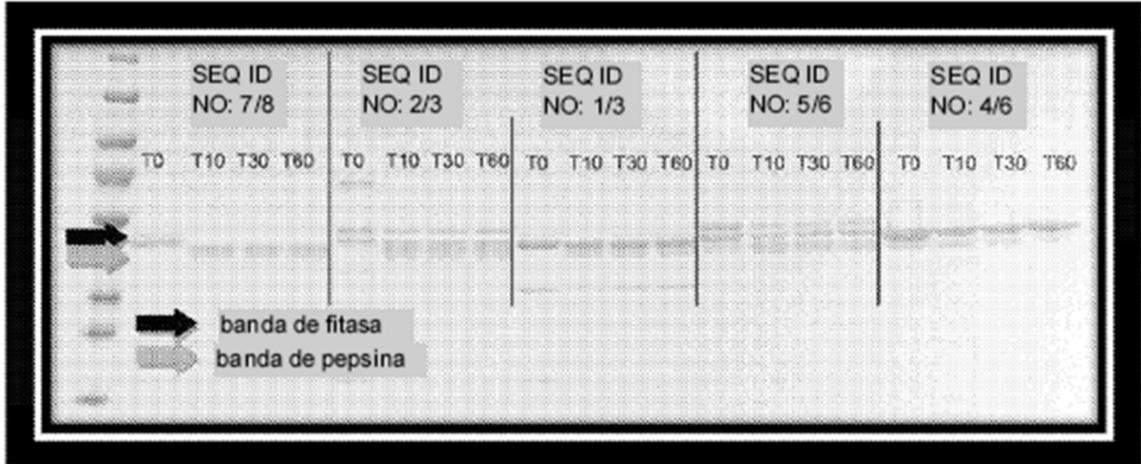


Figura 6

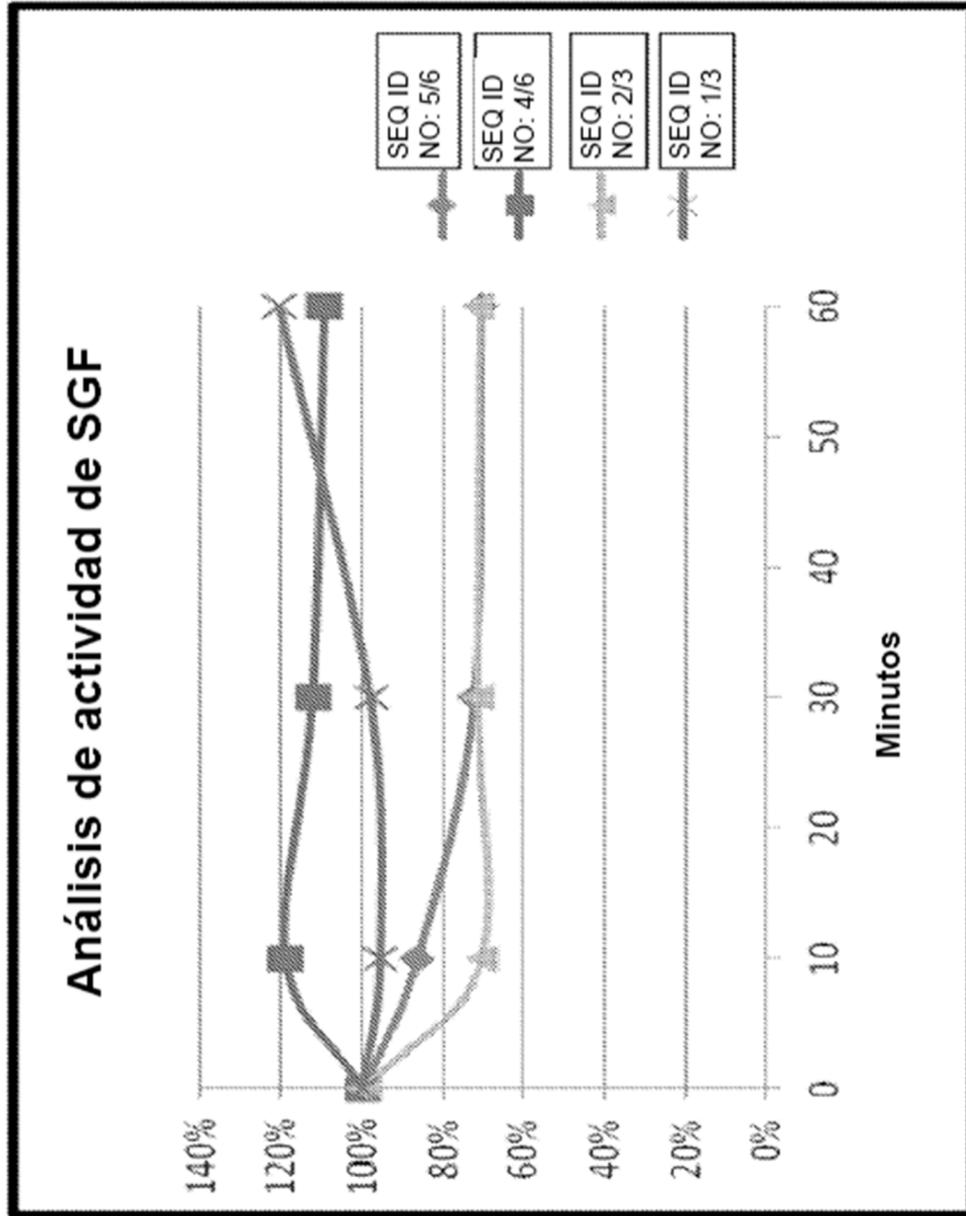


Figura 7

