

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 492 469**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/24** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.02.2008 E 08709070 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.06.2014 EP 2113027**

54 Título: **Nueva sialidasa**

30 Prioridad:

**20.02.2007 EP 07102688**

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

**09.09.2014**

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)  
HET OVERLOON 1  
6411 TE HEERLEN, NL**

72 Inventor/es:

**VAN DIJK, ALBERTUS ALARD;  
DEKKER, PETRUS JACOBUS THEODORUS y  
EFIMOVA, YULIA M.**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 492 469 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

Nueva sialidasa.

**Campo de la invención**

La invención se refiere a una nueva sialidasa.

**5 Antecedentes de la invención**

Los ácidos siálicos comprenden una familia de aproximadamente 40 derivados del ácido neuramínico, azúcar de nueve carbonos. Es un ácido orgánico fuerte con un  $pK_a$  de alrededor de 2,2. La forma no sustituida, ácido neuramínico, no existe en la naturaleza. El grupo amino se acetila normalmente para proporcionar ácido N-acetilneuramínico, la forma más extendida de ácido siálico, pero también existen otras formas (Traving *et al* Cell Mol Life Sci (1.998) 54, 1.330-1.349). Se han encontrado ácidos siálicos en el reino animal, de los equinodermos hasta los seres humanos mientras no hay indicio de su existencia en animales inferiores del linaje protostomate o en las plantas. La única excepción conocida es la existencia de ácido polisialico en larvas del insecto *Drosophila*. Además hay ácidos siálicos en algunos protozoos, virus y bacterias. Los sialoglucoconjugados están presentes en superficies celulares así como en membranas intracelulares. En animales superiores también son importantes componentes del suero y de sustancias mucosas.

Los ácidos siálicos presentan una variedad de funciones biológicas. Debido a su carga negativa los ácidos siálicos están implicados en la unión y el transporte de moléculas cargadas de manera positiva como los iones calcio, así como en fenómenos de atracción y repulsión entre células y moléculas. Su posición terminal expuesta en cadenas de carbohidratos, además de su tamaño y carga negativa les permite una función como cubierta protectora para la parte sub-terminal de la molécula o la célula. Pueden evitar *por ej.*, que las glicol-proteínas se degraden por proteasas o la infección bacteriana de la capa mucosa del sistema respiratorio. Un fenómeno interesante es el efecto extendedor que se ejerce sobre moléculas que contienen ácido siálico debido a las fuerzas repulsivas que actúan entre sus cargas negativas. Esto estabiliza la correcta conformación de enzima o (gluco)-proteínas de membrana y es importante para el carácter viscoso y la función deslizante y protectora resultante de sustancias mucosas, tales como sobre la superficie del ojo o sobre el epitelio de la mucosa (Traving *et al* Cell Mol Life Sci (1.998) 54, 1.330-1.349). Claramente, el tratamiento de dichas sustancias que contienen ácido siálico con una sialidasa adecuada puede afectar espectacularmente a las propiedades biológicas y las características físicas de dichas sustancias. El tratamiento de proteínas que contienen ácido siálico con una sialidasa puede hacer que sean mucho más fáciles de degradar por las proteasas, el tratamiento de sustancias mucosas con sialidasa podía reducir enormemente o eliminar sus características viscosas. Dichos cambios serían interesantes en caso de que dichas proteínas requieran procedimientos industriales de elaboración (por ej., proteólisis) para por ej., hidrolizados de proteínas.

Los ácidos siálicos forman parte de una variedad de procedimientos de reconocimiento entre células y moléculas. Así, el sistema inmunitario puede distinguir entre autoestructuras y no autoestructuras según su modelo de ácido siálico. El azúcar representa un determinante antigénico, por ejemplo sustancias del grupo sanguíneo y es un componente necesario de los receptores para muchas sustancias endógenas tales como hormonas y citocinas. Además, muchos agentes patógenos tales como las toxinas (*por ej.*, toxina del cólera), virus (*por ej.*, influenza) bacterias (*por ej.*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*) y protozoos (*por ej.*, *Trypanosome cruzi*) también unen células huésped vía receptores que contienen ácido siálico. Otro grupo importante de moléculas que reconocen el ácido siálico pertenece a las lectinas, que son normalmente glucoproteínas oligómeras de las plantas, animales e invertebrados que se unen a restos azúcar específicos. Ejemplos son aglutinina de germen de trigo, aglutinina de *Limulus polyphemus*, aglutinina de *Sambucus negra* y aglutinina de *Malacia enuresis*. Estas lectinas parecen ayudar a la planta en su defensa contra los microorganismos que contienen ácido siálico o los mamíferos que comen plantas. Las contrapartes de los mamíferos de las lectinas incluyen selectivas y siglas (Traving *et al* Cell Mol Life Sci (1.998) 54, 1.330-1.349) y presentan una variedad de funciones fisiológicas. Los ácidos siálicos también pueden ayudar a enmascarar células y moléculas. Los eritrocitos están cubiertos por una capa densa de moléculas de ácido siálico, que se retira escalonadamente durante el ciclo de vida de la célula sanguínea. El penúltimo resto galactosa que representa señales para la degradación llega a ser visible y las células sanguíneas no enmascaradas se unen a macrófagos y fagocitados. Se conocen otros diversos ejemplos de dicha estrategia de enmascaramiento. El enmascaramiento también puede presentar en efecto perjudicial, como se puede observar de algunos de los tumores que se salían a un grado mucho mayor que los correspondientes tejidos. Por consiguiente, las células enmascaradas son invisibles para el sistema inmunitario de defensa y el alto contenido en ácido siálico también puede desempeñar una función en la ausencia de inhibición de crecimiento celular adicional y en la extensión. El efecto de enmascaramiento de los ácidos siálicos también ayuda a esconder sitios antigénicos sobre células parásitas, haciéndolas invisibles para el sistema. Este es el caso para especies microbianas como ciertas cepas *E coli* y gonococo (*Miseria gonorrhoeae*). El tratamiento de dichas especies con una sialidasa afectaría a las posibilidades de esconderse del sistema inmunitario.

Las sialidasas (neuraminidasas, EC 3.2.1.18) hidrolizan la unión de ácido siálico, no reductora, terminal, en glucoproteínas, glucolípidos, gangliósidos, polisacáridos y moléculas sintéticas. Algunas sialidasas, denominadas transsialidasas, también pueden realizar reacciones de transferencia en que transfieren el resto ácido siálico de una a otra molécula. Las sialidasas son comunes en animales del linaje deuterostomate (Echinodermata por Mammalia) y

también en diversos microorganismos que existen en su mayoría como comensales o patógenos de animales. Las sialidasas y sus sialil-sustratos, parecen estar ausentes en las plantas y la mayoría de otros metazoarios. Incluso entre las bacterias, la sialidasa se encuentra de manera irregular a fin de que las especies relacionadas o incluso cepas de una especie difieran en esta propiedad. También se han encontrado sialidasas en virus y protozoos (Traving *et al* Cell Mol Life Sci (1.998) 54, 1.330-1.349). Los micro-organismos que contienen sialidasas con frecuencia viven en contacto con animales superiores como huéspedes, por ejemplo como parásitos. Aquí pueden presentar una función nutricional que permite que sus propietarios eliminen ácidos siálicos del huésped para usar como una fuente de carbono. Para algunos patógenos microbianos, se cree que las sialidasas actúan como factores de virulencia. Sin embargo, la función de las sialidasas como factores en patogénesis es controvertida. Por una parte confirman el impacto de especies microbianas patogénicas como *Clostridium perfringens*. Por otra parte, estas enzimas son factores comunes en el catabolismo de los carbohidratos de muchas especies no patógenas, incluyendo animales superiores. No ejercen, sin embargo, un efecto tóxico directo (Traving *et al* Cell Mol Life Sci (1.998) 54, 1.330-1.349). En su lugar, su efecto perjudicial depende de la cantidad masiva de enzima que se libera en el huésped junto con otros factores tóxicos en la inducción por ácidos siálicos del huésped en condiciones no fisiológicas.

Las sialidasas de mamíferos tienen un tamaño normalmente de aproximadamente 40-45 kDa. No se han indicado intentos para sobreexpresar y producir sialidasas de mamíferos para cantidades industrialmente interesantes. Las sialidasas humanas pueden ser enzimas lisosomales, sitosólicas o ligadas a las membranas (Achyuthan y Achyuthan (2.001) Comp. Biochem. Phys. Parte B, 129, 29-64). Las sialidasas lisosomales son enzimas glucosiladas. Las sialidasas contienen unidades conservadas. La unidad conservada más destacada es la denominada caja Aspa, que es un segmento de aminoácidos de la fórmula general -S-X-D-X-G-X-T-W- donde X representa un resto variable. Esta unidad se encuentra cuatro a cinco veces por todas las secuencias microbianas con la excepción de las sialidasas víricas, en el caso de que se encuentre solamente una vez o dos veces o esté incluso ausente. La tercera caja Aspa se conserva más fuertemente que las cajas Aspa 2 y 4. El espacio entre dos cajas Aspa secuenciales también se conserva entre diferentes estructuras primarias (Traving *et al* Cell Mol Life Sci (1.998) 54, 1.330-1.349). Las cajas Aspa presentan probablemente una función estructural y probablemente no están implicadas en catálisis. A diferencia de las cajas Aspa, la unidad FRIO está situada en la parte N-terminal de las secuencias de aminoácidos. Incluye los aminoácidos -X-R-X-P- con los restos arginina y prolina absolutamente conservados. La arginina está implicada directamente en la catálisis por unión de la molécula sustrato. También es importante para acción catalítica una región rica en ácido glutámico entre las cajas aspa 3 y 4 así como dos restos arginina adicionales (Traving *et al* Cell Mol Life Sci (1.998) 54, 1.330-1.349).

Las sialidasas microbianas se pueden clasificar en dos grupos según su tamaño: proteínas pequeñas de alrededor de 42 kDa y grandes de 60-70 kDa. La estructura primaria de las sialidasas grandes contiene segmentos extra de aminoácidos entre el N-terminal y la segunda caja Asp así como entre la quinta caja Asp y el C-terminal. Se cree que contribuyen a la especificidad del sustrato más amplia de las sialidasas grandes. Como las sialidasas de mamíferos, las contrapartidas bacterianas contienen la unidad F/YRIP y varias cajas Asp. Las sialidasas bacterianas con frecuencia están implicadas en infecciones mucosales y virulencia. Debido a esto, las sialidasas bacterianas más grandes no se consideran adecuadas para el uso como agente auxiliar de elaboración en aplicaciones alimentarias y farmacéuticas. Las sialidasas pequeñas (mismo tamaño que las sialidasas de mamíferos) se han identificado en bacterias, como se indicó anteriormente. Es decir, *Clostridium perfringens* contiene una sialidasa pequeña con un tamaño de ~40 kDa, sin las extensiones comunes a las sialidasas en otras bacterias. Esta sialidasa *Clostridium* sin embargo no se segrega por la bacteria y por lo tanto no está implicada tampoco en la virulencia (Roggentin *et al*. (1.995) Biol Chem Hoppe Seyler 376, 569-575). Es tentador especular que sólo están implicadas las sialidasas bacterianas con extensiones extra en la patogenicidad. La sobreexpresión de las sialidasas bacterianas en *E. coli* en general conduce a baja productividad; la sialidasa pequeña *Clostridium* sólo se podía producir a 1 mg/l como proteína intracelular en *E. coli* (Kruse *et al*. (1.996) Protein Expr Purif. 7, 415-422).

Uchida *et al* (Biochimica et Biophysica Acta, vol. 350, nº 2, 1.974 págs. 425-431) describen la identificación sistemática de neuraminidasas microbianas que son inducidas por ácido colomínico. Entre los 1.000 microorganismos identificados sistemáticamente, se obtuvieron neuraminidasas de *Sporotrichium schenckii*, *Penicillium urticae* y *Streptomyces sp.* *Penicillium urticae* no es un organismo de producción adecuado para sialidasa de calidad alimentaria, puesto que es un hongo implicado en el deterioro de los alimentos y *Sporotrichium schenckii* es un hongo patógeno. De la bacteria *Streptomyces sp* no está determinado el nombre de la especie. No se conoce el PM de las sialidasas mencionadas en este artículo. En Iwamori *et al* (J. Biochem. 138, págs. 327-334) se describe una sialidasa de *Arthrobacter ureafaciens* bacteriana. Sin embargo se sabe que esta neuraminidasa bacteriana está relacionada con la Formación de Sincicio Mediada por VIH-1 y el Procedimiento de Unión/Entrada de Virus (Sun *et al*, Virology 284, págs. 26-36, 2.001). Hay, por lo tanto, una clara necesidad de una sialidasa no virulenta, pequeña producida para aplicaciones en alimentos y farmacia.

Especialmente sería un beneficio el hallazgo de una sialidasa fúngica segregada, puesto que las enzimas segregadas se pueden sobreexpresar y purificar fácilmente en grandes cantidades a partir de un cultivo fúngico. Esto reduciría el coste-precio para la producción de una sialidasa espectacularmente.

## Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un polipéptido aislado que presenta actividad sialidasa y que tiene al menos 70% de identidad de secuencias de aminoácidos con los aminoácidos 1 a 407 de la SEC ID N° 3 o que presenta una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad de secuencias de aminoácidos con los aminoácidos 34 a 407 de la SEC ID N° 3. También se describe un polipéptido que se codifica mediante un polinucleótido que se hibrida en condiciones de bajo rigor con (i) la secuencia de ácidos nucleicos de la SEC ID N° 1 ó 2 que es al menos 80% o 90% idéntica sobre 60, preferiblemente sobre 100 nucleótidos, más preferiblemente al menos 90% idéntica sobre 200 nucleótidos o (ii) una secuencia de ácidos nucleicos complementaria a la secuencia de ácidos nucleicos de la SEC ID N° 1 ó 2. Preferiblemente, el polipéptido de la invención presenta un PM (peso molecular) menor que 55 kD (SDS-page), más preferiblemente el polipéptido presenta un PM (peso molecular) menor que 52 kD (SDS-page) o el polipéptido presenta un PM (peso molecular) menor que 50 kDa (calculado en base a secuencia de aminoácidos), más preferiblemente el polipéptido presenta un PM (peso molecular) menor que 45 kDa (calculado en base a secuencia de aminoácidos).

En la presente memoria se describe un polipéptido que tiene actividad sialidasa y que no es virulento. También se describe un polipéptido que tiene actividad sialidasa, dicho polipéptido es una sialidasa fúngica que presenta un PM (peso molecular) menor que 55 kDa (SDS-page), más preferiblemente la sialidasa fúngica presenta un PM (peso molecular) menor que 52 kDa (SDS-page) o la sialidasa fúngica presenta un PM (peso molecular) menor que 50 kDa (calculado en base a secuencia de aminoácidos), más preferiblemente la sialidasa fúngica presenta un PM (peso molecular) menor que 45 kDa (calculado en base a secuencia de aminoácidos).

Preferiblemente, el polipéptido de la invención que presenta una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, incluso más preferiblemente al menos 90%, lo más preferiblemente al menos 95% e incluso lo más preferiblemente al menos aproximadamente 97% de identidad con los aminoácidos 1 a 407 de la SEC ID N° 3 o con los aminoácidos 34 a 407 de la SEC ID N° 3. La presente invención también se refiere a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido de la reivindicación 1, por ejemplo, uno que se hibrida con la SEC ID N° 1 ó 2 en condiciones de bajo rigor, más preferiblemente condiciones de rigor medio y lo más preferiblemente condiciones de rigor alto. Además, la presente invención describe una construcción de ácidos nucleicos que comprende el polinucleótido de la invención unido de manera operable a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un huésped de expresión adecuado. Por otra parte, la presente invención proporciona un vector de expresión recombinante que comprende esta construcción de ácidos nucleicos y una célula huésped recombinante que comprende dicha construcción de ácidos nucleicos. Según otro aspecto de la invención, se describe un método para producir el polipéptido de la invención que comprende cultivar una cepa/ célula huésped recombinante como se mencionó anteriormente, para producir un sobrenadante y/o células que comprenden el polipéptido y recuperar el polipéptido. Según un aspecto más de la invención se describe un método para producir el polipéptido de la invención que comprende cultivar una célula huésped que comprende una construcción de ácidos nucleicos que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido en condiciones adecuadas para la producción del polipéptido y recuperar el polipéptido. El polipéptido de la invención que tiene actividad sialidasa es de manera ventajosa no virulento. El polipéptido de la invención se puede usar en la preparación de alimento o alimentación, o como medicamento o parte de un medicamento.

## Descripción detallada de la invención

Según la presente invención se describe una sialidasa de pequeño tamaño que presenta preferiblemente que tiene un PM (peso molecular) menor que 55 kDa (SDS-page), más preferiblemente el polipéptido tiene un PM (peso molecular) menor que 52 kDa (SDS-page) o una sialidasa que tiene un PM (peso molecular) menor que 50 kDa (calculado en base a secuencia de aminoácidos), más preferiblemente el polipéptido tiene un PM (peso molecular) menor que 45 kDa (calculado en base a secuencia de aminoácidos). De manera ventajosa, la sialidasa de la invención una enzima extracelular. Por otra parte, la sialidasa es preferiblemente de origen fúngico. En general, el polipéptido de la invención presentará un PM (peso molecular) mayor que 35 kDa (SDS-page), más preferiblemente el polipéptido presenta un PM (peso molecular) mayor que 40 kDa (SDS-page) o el polipéptido presentará un PM (peso molecular) mayor que 35 kDa (calculado en base a secuencia de aminoácidos), más preferiblemente el polipéptido presenta un PM (peso molecular) mayor que 40 kDa (calculado en base a secuencia de aminoácidos).

Una exoenzima o enzima extracelular, es una enzima que es segregada por una célula y que actúa fuera de esa célula. Normalmente se usa para romper moléculas grandes que no podrían entrar en la célula de otro modo. Es una enzima que segregan los organismos en el entorno que actúa fuera del microbio. Lo contrario a una exoenzima se denomina una endoenzima o enzima intracelular (la fuente es Wikipedia).

La teoría de los presentes autores es que en general las sialidasas grandes se relacionan con infecciones mucosales y virulencia y, por lo tanto, no son adecuadas en aplicaciones alimentarias o farmacéuticas. A diferencia de esto, se cree que las sialidasas pequeñas son adecuadas para aplicaciones alimentarias o farmacéuticas.

Sin embargo, la presente invención no reposa o se encuentra en la exactitud de esta teoría. La presente invención proporciona una sialidasa extracelular que tiene un presenta un PM (peso molecular) menor que 55 kDa (SDS-page), más preferiblemente la sialidasa tiene un PM (peso molecular) menor que 52 kDa (SDS-page) o una sialidasa

extracelular que tiene un PM (peso molecular) menor que 50 kDa (calculado en base a secuencia de aminoácidos), más preferiblemente la sialidasa presenta un PM (peso molecular) menor que 45 kDa (calculado en base a secuencia de aminoácidos).

La presente invención se refiere a una nueva sialidasa que se ha identificado en el hongo *Penicillium chrysogenum*.

5 De manera ventajosa, la presente invención satisface la demanda de una sialidasa que se puede producir en altas cantidades. Preferiblemente, dicha sialidasa es segregada de la célula huésped. La segregación activa es de importancia primordial para un procedimiento de producción económica debido a que permite la recuperación de la enzima en una forma casi pura sin ir a través de incómodos procedimientos de purificación. La sobre-expresión de dicha sialidasa segregada de manera activa por un huésped fúngico de calidad alimentaria tal como *Aspergillus*,  
10 proporciona una enzima de calidad alimentaria y un procedimiento de producción de coste eficaz y es, por lo tanto, preferible. La sialidasa segregada en el momento presente se encuentra por vez primera en hongos filamentosos. Se describen procedimientos para la producción de sialidasa en grandes cantidades por el huésped de producción de calidad alimentaria *Aspergillus niger*.

15 Desde un punto de vista económico, existe una clara necesidad de un medio mejorado para producir sialidasas en altas cantidades y en una forma relativamente pura, comparado con la deficiente productividad de las sialidasas de mamíferos y bacterias. Una manera preferida de hacer esto es vía la sobreproducción de dicha sialidasa usando técnicas de ADN recombinante. Una manera preferida en particular de hacer esto es vía la sobreproducción de una sialidasa procedente de hongos y una manera lo más preferida de hacer esto es vía la sobreproducción de una sialidasa procedente de *Penicillium*. Para permitir la última ruta de producción es esencial la información de la  
20 secuencia única de una sialidasa procedente de *Penicillium*. Más preferible, la secuencia de nucleótidos completa del gen codificador tiene que estar disponible.

Un medio mejorado para producir la sialidasa segregada recién identificada en altas cantidades y una forma relativamente pura es vía la sobreproducción de la enzima codificada de *Penicillium* usando técnicas de ADN recombinante. Una manera preferida de hacer esto es vía la sobreproducción de dicha sialidasa segregada en un  
25 microorganismo huésped de calidad alimentaria. Microorganismos huésped de calidad alimentaria conocidos incluyen *Aspergilli*, *Trichoderma*, *Streptomyces*, *Bacilli* y levaduras tales como *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*. Una manera incluso más preferida de hacer esto es vía sobreproducción de la sialidasa procedente de *Penicillium* segregada en un hongo de calidad alimentaria tal como *Aspergillus*. Lo más preferido es la sobre producción de la sialidasa segregada en un hongo de calidad alimentaria en que el uso de codón del gen que codifica la sialidasa se ha optimizado para el huésped de expresión de calidad alimentaria usado. En general, para permitir las últimas rutas de optimización, es deseable información única de las secuencias de una sialidasa segregada. Más preferible, la  
30 secuencia de nucleótidos completa del gen que codifica la sialidasa tiene que estar disponible. Una vez que el gen que codifica una sialidasa segregada se transforma en un huésped preferido, las cepas seleccionadas se pueden usar para fermentación y aislamiento de la proteína sialidasa segregada del caldo de fermentación.

35 Una vez que la nueva enzima se ha hecho disponible en grandes cantidades y en un alimento relativamente puro, alimentos (como el queso), hidrolizados de proteínas con propiedades de textura y /o inmunológicas mejoradas se pueden preparar con una calidad alimentaria y de manera económica. La enzima también se puede usar potencialmente como conservante. Eliminando los restos ácido siálico protectores de las paredes bacterianas, los microbios serán reconocidos por el sistema inmunitario y se eliminarán.

40 Un polipéptido de la invención que presenta actividad sialidasa puede estar en una forma aislada. Como se define en la presente memoria, un polipéptido aislado es un polipéptido producido de manera endógena o uno recombinante que está esencialmente exento de otros polipéptidos no sialidasa y es típicamente al menos aproximadamente 20% puro, preferiblemente al menos aproximadamente 40% puro, más preferiblemente al menos aproximadamente 60% puro, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 80% puro, incluso más preferiblemente  
45 aproximadamente 90% puro y lo más preferiblemente aproximadamente 95% puro, cuando se determina por SDS-PAGE. El polipéptido se puede aislar por centrifugación y métodos cromatográficos o cualquier otra técnica conocida en la técnica para obtener proteínas puras a partir de disoluciones brutas. Se entenderá que el polipéptido se puede mezclar con portadores o diluyentes que no interfieren con el fin deseado del polipéptido y así el polipéptido en esta forma aún se considerará como aislado. Comprenderá en general el polipéptido en una preparación en que  
50 más de 20%, por ejemplo más de 30%, 40%, 50%, 80%, 90%, 95% o 99%, en peso de las proteínas en la preparación es un polipéptido de la invención.

Preferiblemente, el polipéptido de la invención se puede obtener de un microorganismo que posea un gen que codifica una enzima con actividad sialidasa. Más preferiblemente, se segrega polipéptido de la invención de un microorganismo. Incluso más preferiblemente el microorganismo es fúngico y óptimamente es un hongo filamentoso.  
55 Los organismos donadores preferidos son así de los genes *Penicillium*, tales como los de las especies *Penicillium chrysogenum*. En una primera realización, la presente invención proporciona un polipéptido aislado con una secuencia de aminoácidos que presenta un grado de identidad de secuencias de aminoácidos para los aminoácidos 1 a 407 de la SEC ID N° 3 (es decir, el polipéptido) o para los aminoácidos 34 a 407 de la SEC ID N° 3 de al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, incluso más preferiblemente al menos 90%, incluso más preferiblemente al menos 95% y lo más preferiblemente al menos 97% y que presenta actividad sialidasa.  
60

Para los fines de la presente invención, el grado de identidad entre dos o más secuencias de aminoácidos se determina por el programa de investigación de bases de datos de proteínas BLAST P (Altschul et al., 1.997, Nucleic Acids Research 25: 3.389-3.402) con matriz Blosum 62 y un umbral esperado de 10.

5 Un polipéptido de la invención puede comprender la secuencia de aminoácidos explicada en la SEC ID N° 3 o una secuencia sustancialmente homóloga o un fragmento de cualquier secuencia con actividad sialidasa. En general, se prefiere la secuencia de aminoácidos que se encuentra en la naturaleza mostrada en la SEC ID N° 3.

10 Un aspecto de la invención es un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 3 según lo cual se elimina la secuencia señal. Las enzimas segregadas, como la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 3, con frecuencia se sintetizan incluyendo una pre-secuencia o secuencia señal y / o una pro-secuencia. Estas secuencias se eliminan con frecuencia de la proteína durante o después del procedimiento de secreción. La proteína segregada madura, por lo tanto, con frecuencia no contiene más estas pre- y pro-secuencias. Por lo tanto, un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad de secuencias de aminoácidos con los aminoácidos 1 a 407 de la SEC ID N° 3 y que carece de posibles pre- o pro-secuencias es parte de la presente invención. Un posible sitio de tratamiento en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 3 es después del aminoácido 33. La enzima madura según la invención empezará en este caso en el aminoácido número 15 34. Otras modificaciones de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 3 debido a tratamiento adicional, tal como eliminación de aminoácidos, están permitidas siempre que no alteren la actividad de la enzima.

El polipéptido de la invención también puede comprender una variante que se encuentra en la naturaleza o especie homóloga del polipéptido de la SEC ID N° 3.

20 Una variante es un polipéptido que se encuentra de manera natural en, por ejemplo, células fúngicas, bacterianas, de levaduras o plantas, la variante que tiene actividad sialidasa y una secuencia sustancialmente similar a la proteína de la SEC ID N° 3. El término "variantes" se refiere a polipéptidos que presentan el mismo carácter esencial o funcionalidad biológica básica que la sialidasa de la SEC ID N° 3 e incluye variantes alélicas. Preferiblemente, un polipéptido variante presenta al menos el mismo nivel de actividad sialidasa que el polipéptido de la SEC ID N° 3. Las variantes incluyen variantes alélicas de la misma cepa que el polipéptido de la SEC ID N° 3 o de una cepa diferente del mismo género o especie. 25

De manera similar, un homólogo de la especie de la proteína inventiva es una proteína equivalente de secuencia similar que es una sialidasa y que se encuentra de manera natural en otras especies.

30 Se pueden aislar variantes y homólogos de especies usando los procedimientos descritos en la presente memoria y realizando dichos procedimientos en una fuente celular adecuada, por ejemplo una célula bacteriana, de levadura, fúngica o de planta. También es posible usar una sonda para sondear librerías de ADN hechas de células bacterianas, de levadura, fúngicas o de plantas para obtener clones que expresen variantes u homólogos de especies del polipéptido de la SEC ID N° 3. Los métodos que se pueden usar para aislar variantes y homólogos de especies de un gen conocido se describen de manera extensa en la bibliografía y son conocidos para los expertos en la materia. 35 Estos genes se pueden manipular por técnicas convencionales para generar un polipéptido de la invención que después de eso se puede producir por técnicas recombinantes o sintéticas conocidas de por sí.

40 La secuencia del polipéptido de la SEC ID N° 3 y de variantes y homólogos de especies también se puede modificar para proporcionar polipéptidos de la invención. Se pueden hacer sustituciones de aminoácidos, por ejemplo de 1, 2 ó 3 a 10, 20 ó 30 sustituciones. También se puede hacer el mismo número de supresiones e inserciones. Estos cambios se pueden hacer fuera de regiones críticas para la función del polipéptido, ya que dicho polipéptido modificado retendrá su actividad sialidasa.

45 Los polipéptidos de la invención incluyen fragmentos de los polipéptidos de longitud completa ya mencionados y de variantes de los mismos, incluyendo fragmentos de la secuencia presentados en la SEC ID N° 3. Dichos fragmentos retendrán típicamente actividad como sialidasa. Los fragmentos pueden tener al menos 50, 100 ó 200 aminoácidos de largo o pueden tener este número de aminoácidos pequeño de la secuencia de longitud completa mostrada en la SEC ID N° 3.

50 Los polipéptidos de la invención, si es necesario, se pueden producir por medios sintéticos aunque normalmente se prepararán de manera recombinante como se describe a continuación. Los polipéptidos sintéticos y recombinantes se pueden modificar, por ejemplo, por adición de restos histidina o una etiqueta T7 para ayudar a su identificación o purificación o por adición de una secuencia señal para activar su secreción de una célula.

55 Así, las secuencias de variantes pueden comprender las procedentes de cepas de *Penicillium* distintas de la cepa de la que se aisló el polipéptido de la SEC ID N° 3. Las variantes se pueden identificar de otras cepas *Penicillium* buscando actividad sialidasa y clonando y secuenciando como se describe en la presente memoria. Las variantes pueden incluir la supresión, modificación o adición de aminoácidos únicos o grupos de aminoácidos dentro de la secuencia proteica, siempre que el péptido mantenga la funcionalidad biológica básica de la sialidasa de la SEC ID N° 3.

Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos, por ejemplo de 1, 2 o de 3 a 10, 20 ó 30 sustituciones. El

polipéptido modificado retendrá en general actividad como sialidasa. Se pueden realizar sustituciones conservadoras; dichas sustituciones son conocidas en la técnica.

5 Se describen secuencias de polipéptidos más cortas o más largas en la presente memoria. Por ejemplo, un péptido de al menos 50 aminoácidos o hasta 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700 ó 800 aminoácidos de longitud siempre que demuestre la funcionalidad biológica básica de la sialidasa de la SEC ID N° 3. En particular, pero no exclusivamente, esto incluye la situación en que la proteína es un fragmento de la secuencia proteica completa.

La presente invención también se refiere a un polinucleótido que codifica un polipéptido que presenta actividad sialidasa, dicho polinucleótido comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica el aminoácido de la SEC ID N° 3 o los aminoácidos 34 a 407 de la SEC ID N° 3.

10 Para la presente invención es especialmente importante que la proteína de interés se segregue de manera activa en el medio de cultivo. Las proteínas segregadas se sintetizan normalmente originalmente como pre-proteínas y la pre-secuencia (secuencia señal) se retira con posterioridad durante el procedimiento de secreción. El procedimiento de secreción es básicamente similar en procariotas y eucariotas: la pre-proteína segregada de manera activa se ensarta a través de una membrana, se retira la secuencia señal mediante una peptidasa de señal específica y se  
15 (re)pliega la proteína madura. También para la secuencia señal se puede reconocer una estructura general. Las secuencias señal para secreción se sitúan en el amino-terminal de la pre-proteína, y son en general 15-35 amino-ácidos de longitud. El amino-terminal contiene preferiblemente amino-ácidos cargados de manera positiva y preferiblemente no amino-ácidos ácidos. Se cree que esta región cargada de manera positiva interactúa con los grupos de cabeza cargados de manera negativa de los fosfolípidos de la membrana. Esta región va seguida por una  
20 región de núcleo de expansión de la membrana, hidrófoba. Esta región tiene en general 10-20 amino-ácidos de longitud y consta principalmente de amino-ácidos hidrófobos. Normalmente no hay amino-ácidos cargados en esta región. La región de expansión de la membrana va seguida por el sitio de reconocimiento para la peptidasa señal. El sitio de reconocimiento consta de amino-ácidos con la preferencia por pequeño-X-pequeño. Pueden ser amino-ácidos pequeños alanina, glicina, serina o cisteína. X puede ser cualquier aminoácido. Usando dichas reglas se ha escrito un algoritmo que puede reconocer dichas secuencias señal de eucariotas y procariotas (Bendtsen, Nielsen, von Heijne y Brunak. (2.004) J. Mol. Biol., 340: 783-795). El programa SignalP para calcular y reconocer secuencias señal en  
25 proteínas está disponible en general (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

30 Es importante para la presente invención que las secuencias señal se puedan reconocer de la secuencia proteica deducida de un gen secuenciado. Si un gen codifica una proteína en el caso de que se prevea una secuencia señal usando el programa SignalP, la probabilidad de que esta proteína se segregue es alta.

Se describe en la presente memoria un polipéptido aislado que presenta actividad sialidasa y se codifica por polinucleótidos que se hibridan o son capaces de hibridarse en condiciones de bajo rigor, más preferiblemente condiciones de rigor medio y lo más preferiblemente condiciones de rigor alto, con (i) la secuencia de ácidos nucleicos de la SEC ID N° 1 o (ii) un fragmento de ácidos nucleicos que comprende al menos una porción de la SEC ID N° 1 o  
35 (iii) que tiene bases que difieren de las bases de la SEC ID N° 1 o (iv) con una cadena de ácidos nucleicos complementaria a la SEC ID N° 1.

40 El término "capaz de hibridación" significa que el polinucleótido diana de la invención puede hibridar al ácido nucleico usado como para sondar (por ejemplo, la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N° 1 o un fragmento de la misma o el complemento de la SEC ID N° 1 o un fragmento del mismo) a un nivel significativamente por encima del fondo. La invención también incluye los polinucleótidos que codifican la sialidasa de la invención, así como secuencias de nucleótidos que son complementarias a los mismos. La secuencia de nucleótidos puede ser ARN o ADN, incluyendo ADN genómico, ADN sintético o ADNc. Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos es ADN y lo más preferiblemente, una secuencia de ADN genómico. Típicamente, un polinucleótido de la invención comprende una secuencia contigua de nucleótidos que es capaz de hibridación en condiciones selectivas a la secuencia  
45 codificadora o el complemento de la secuencia codificadora de la SEC ID N° 1. Dichos nucleótidos se pueden sintetizar según métodos conocidos en la técnica.

Dicho polinucleótido puede hibridar a la secuencia codificadora o el complemento de la secuencia codificadora de la SEC ID N° 2 a un nivel significativamente por encima del fondo. Puede tener lugar hibridación de fondo, por ejemplo, debido a otros ADNc presentes en una biblioteca de ADNc. El nivel de señal generado por la interacción entre un polinucleótido de la invención y la secuencia codificadora o complemento de la secuencia codificadora de la SEC ID N° 2 es típicamente al menos 10 veces, preferiblemente al menos 20 veces, más preferiblemente al menos 50 veces e incluso más preferiblemente al menos 100 veces, tan intenso como las interacciones entre otros polinucleótidos y la secuencia codificadora de la SEC ID N° 2. La intensidad de interacción se puede medir, por ejemplo, por radioetiquetado de la sonda, por ejemplo con <sup>32</sup>P. Se puede conseguir hibridación selectiva típicamente usando  
55 condiciones de bajo rigor (cloruro de sodio 0,3 M y citrato de sodio 0,03 M a aproximadamente 40°C), rigor medio (por ejemplo, cloruro de sodio 0,3 M y citrato de sodio 0,03 M a aproximadamente 50°C) o alto rigor (por ejemplo, cloruro de sodio 0,3 M y citrato de sodio 0,03 M a aproximadamente 60°C).

Un polinucleótido de la invención también incluye genes sintéticos que pueden codificar el polipéptido de la SEC ID N°

3 o variantes de la misma. A veces es preferible adaptar el uso del codón de un gen para el sesgo preferido en un huésped de producción. Las técnicas para diseñar y construir genes sintéticos están disponibles en general (es decir, <http://www.dnatwopoen.com/>).

#### Modificaciones

5 Los polinucleótidos de la invención pueden comprender ADN o ARN. Pueden ser monocatenarios o bicatenarios. También pueden ser polinucleótidos que incluyen entre ellos nucleótidos sintéticos o modificados incluyendo ácidos nucleicos de péptidos. Se conoce una serie de diferentes tipos de modificaciones a polinucleótidos en la técnica. Estos incluyen una cadena principal de metilfosfonato y fosforotioato y adición de cadenas de acridina o polilisina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. Para los fines de la presente invención, se tiene que entender que los polinucleótidos descritos en la presente memoria se pueden modificar por cualquier método disponible en la técnica.

10 Se tiene que entender que los expertos pueden realizar, usando técnicas de rutina, sustituciones de nucleótidos que no afecten a la secuencia del polipéptido codificada por los polinucleótidos de la invención para reflejar el uso del codón de cualquier organismo huésped particular en que se tienen que expresar los polipéptidos de la invención.

15 La secuencia codificadora de la SEC ID N° 2 se puede modificar por sustituciones de nucleótidos, por ejemplo de 1, 2 ó 3 a 10, 25, 50, 100 o más sustituciones. El polinucleótido de la SEC ID N° 2 se puede modificar alternativamente o adicionalmente por una o más inserciones y/o supresiones y/o por una extensión en cualquier extremo o en ambos. El polinucleótido modificado codifica en general un polipéptido que presenta actividad sialidasa. Se pueden realizar sustituciones degeneradas y/o se pueden realizar sustituciones que darían como resultado una sustitución de aminoácidos conservadora cuando se traduce la secuencia modificada, por ejemplo como se discutió con referencia a polipéptidos más tarde.

#### Homólogos

25 Una secuencia de nucleótidos que es capaz de hibridar de manera selectiva el complemento de la secuencia codificadora de ADN de la SEC ID N° 2 presentará en general al menos 50% o 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencias para la secuencia codificadora de la SEC ID N° 2 por una región de al menos 60, preferiblemente al menos 100, más preferiblemente al menos 200 nucleótidos contiguos o lo más preferiblemente por la longitud total de la SEC ID N° 2. Asimismo, un nucleótido que codifica una sialidasa activa y puede ser capaz de hibridar de manera selectiva a un fragmento de un complemento de la secuencia codificadora de ADN de la SEC ID N° 2.

30 Cualquier combinación de los grados de identidad y tamaños mínimos ya mencionados se puede usar para definir polinucleótidos como se describe en la presente memoria, prefiriéndose las combinaciones más rigurosas (es decir, mayor identidad sobre longitudes más largas). Así, por ejemplo, se describe un polinucleótido que es al menos 80% o 90% idéntico sobre 60, preferiblemente sobre 100 nucleótidos como un polinucleótido que es al menos 90% idéntico sobre 200 nucleótidos.

35 El algoritmo BLAST N se puede usar para calcular la identidad de secuencias o alinear secuencias (tal como identificar secuencias equivalentes o correspondientes, por ejemplo en sus ajustes por defecto).

40 El programa informático para realizar análisis BLAST está disponible públicamente por el Centro Nacional para la Información de Biotecnología (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica identificar primero un par de secuencias de alta puntuación (HSPs) por identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia de búsqueda que equipare o satisfaga alguna puntuación T umbral de valor positivo cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se refiere como el umbral de puntuación de la palabra próxima. Estos resultados de palabra próxima iniciales actúan como simiente para iniciar búsquedas para encontrar HSPs que las contengan. Los resultados de la palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia en cuanto a que se puede aumentar la puntuación de alineación acumulada. Las extensiones para los resultados de la palabras en cada dirección se detienen cuando: la puntuación de la alineación acumulativa cae por la cantidad X de su valor máximo conseguido; la puntuación acumulativa va a cero o por debajo, debido a la acumulación de una o más alineaciones de restos de puntuación negativa o se alcanza el extremo de cualquier secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLAST usa como defectos una longitud de palabra (W) de 11, las alineaciones de la matriz de puntuación BLOSUM62 (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=4 y una comparación de las dos cadenas.

50 El algoritmo BLAST realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias. Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual una equiparación entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos tendría lugar por azar. Por ejemplo, una secuencia se considera similar a otra secuencia si la probabilidad de suma más pequeña en comparación con la primera secuencia a la segunda secuencia es menor que aproximadamente 1, preferiblemente menor que aproximadamente 0,1, más preferiblemente menor que aproximadamente 0,01 y lo más preferiblemente menor que aproximadamente 0,001.

## Cebadores y Sondas

Los polinucleótidos de la invención incluyen y se pueden usar como cebadores, por ejemplo como cebadores de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como cebadores para reacciones alternativas de multiplicación o como sondas por ejemplo etiquetadas con una etiqueta reveladora por medios convencionales usando etiquetas radiactivas o no radiactivas o se pueden clonar los polinucleótidos en vectores. Dichos cebadores, sondas y otros fragmentos tendrán al menos 15, por ejemplo al menos 20, 25, 30 ó 40 nucleótidos de longitud. Típicamente tendrán hasta 40, 50, 60, 70, 100, 150, 200 ó 300 nucleótidos de longitud o incluso hasta algunos nucleótidos (tales como 5 ó 10 nucleótidos) cortos de la secuencia codificadora de la SEC ID N° 2.

En general, se producirán cebadores por medios sintéticos, que implica una fabricación etapa por etapa de la secuencia de ácidos nucleicos deseada un nucleótido cada vez. Las técnicas para cumplir esto y los protocolos están disponibles fácilmente en la técnica. En general se producirán polinucleótidos más largos usando medios recombinantes, por ejemplo usando técnicas de clonación PCR. Esto implicará preparar un par de cebadores (típicamente de aproximadamente 15 - 30 nucleótidos) para multiplicar la región deseada de la sialidasa que se tiene que clonar, poniendo en contacto los cebadores con ARNm, ADNc o ADN genómico obtenido de una célula de levadura, bacteria, planta, procariota o fúngica, preferiblemente de una cepa *Penicillium*, realizando una reacción en cadena de la polimerasa en condiciones adecuadas para la multiplicación de la región deseada, aislamiento del fragmento multiplicado (por ej., purificando la mezcla de reacción sobre un gel de agarosa) y recuperando el ADN multiplicado. Los cebadores pueden estar diseñados para contener sitios de reconocimiento de enzimas de restricción adecuados a fin de que se pueda clonar el ADN multiplicado en un vector de clonación adecuado, tal como se describe en el Ejemplo 1.

Alternativamente, se pueden construir genes sintéticos que incluyen la región codificadora de la sialidasa segregada o variantes de los mismos. Los polinucleótidos que se modifican en muchas posiciones, pero aún codifican la misma proteína se pueden diseñar y construir de manera conveniente usando estas técnicas. Esto presenta como ventaja que el uso de codón se puede adaptar al huésped de expresión preferido, así la productividad de la proteína en este huésped se puede mejorar. También se puede cambiar la secuencia de polinucleótidos de un gen para mejorar la estabilidad de ARNm o recambio reducido. Esto puede conducir a expresión mejorada de la proteína deseada o variantes de la misma. Adicionalmente, la secuencia de polinucleótidos se puede cambiar en un gen sintético de manera que las mutaciones se realicen en la secuencia proteica que presente un efecto positivo sobre la eficacia de la secreción, estabilidad, vulnerabilidad proteolítica, temperatura óptima, actividad específica u otras propiedades importantes para producción o aplicación industrial de la proteína. Las compañías que proporcionan servicios para construir genes sintéticos y optimizar el uso de codones están disponibles en general.

Dichas técnicas se pueden usar para obtener todo o parte de los polinucleótidos que codifican las secuencias de la sialidasa descritas en la presente memoria. Los intrones, regiones activadoras y de remolque están dentro del alcance de la invención y también se pueden obtener de una manera análoga (por ej., por medios recombinantes, PCR o técnicas de clonación), empezando con ADN genómico a partir de una célula fúngica, de levadura, bacteria, planta o procariota.

Los polinucleótidos o cebadores pueden soportar una etiqueta reveladora. Las etiquetas adecuadas incluyen radioisótopos tales como <sup>32</sup>P o <sup>35</sup>S, etiquetas fluorescentes, etiquetas de enzimas u otras etiquetas de proteínas tales como biotina. Dichas etiquetas se pueden añadir a polinucleótidos o cebadores de la invención y se pueden detectar usando técnicas conocidas para los expertos en la materia.

Los polinucleótidos o cebadores (o fragmentos de los mismos) etiquetados o no etiquetados se pueden usar en ensayos a base de ácidos nucleicos para detectar o secuenciar una sialidasa o una variante de la misma en una muestra fúngica. Dichos ensayos de detección comprenderán en general poner en contacto una muestra fúngica que se sospecha que contiene el ADN de interés con una sonda que comprende un polinucleótido o cebador de la invención en condiciones de hibridación y detectar cualquier dúplex formado entre la sonda y el ácido nucleico en la muestra. La detección se puede conseguir usando técnicas tales como PCR o inmovilizando la sonda sobre un soporte sólido, retirando cualquier ácido nucleico en la muestra que no esté hibridado a la sonda y detectando después todo ácido nucleico que se hibride a la sonda. Alternativamente, se puede inmovilizar el ácido nucleico de la muestra sobre un soporte sólido, la sonda hibridada y la cantidad de sonda ligada a dicho soporte después de la eliminación de cualquier sonda no ligada detectada.

Las sondas de la invención también se pueden empaquetar de manera conveniente en forma de un estuche de ensayo en un envase adecuado. En dichos estuches la sonda puede estar ligada a un soporte sólido en caso de que el formato del ensayo para el que se diseña el estuche requiera dicha unión. El estuche también puede contener reactivos adecuados para tratar la muestra que se tiene que sondear, hibridando la sonda a ácido nucleico en la muestra, reactivos de control, instrucciones y similares. Las sondas y los polinucleótidos de la invención también se pueden usar en microensayo.

Preferiblemente, el polinucleótido de la invención se puede obtener del mismo organismo que el polipéptido, tal como un hongo, en particular un hongo del género *Aspergillus*.

## Producción de polinucleótidos

Los polinucleótidos que no presentan 100% de identidad con la SEC ID N° 2 pero caen dentro del alcance de la invención se pueden obtener de una serie de maneras. Así, se pueden obtener variantes de la secuencia de la sialidasa descritas en la presente memoria por ejemplo, sondeando bibliotecas de ADN genómico hechas de una serie de organismos, tales como los discutidos como fuentes de los polipéptidos de la invención. Además, se pueden obtener otros homólogos fúngicos, de plantas o procariotas de la sialidasa y dichos homólogos y fragmentos de los mismos en general se podrán hibridar a la SEC ID N° 1. Dichas secuencias se pueden obtener sondeando bibliotecas de ADNc o bibliotecas de ADN genómico de otras especies y sondeando dichas bibliotecas con sondas que comprenden todo o parte de la SEC ID N° 1 en condiciones de rigor bajo, medio a alto (como se describió anteriormente). Las sondas de ácidos nucleicos que comprenden todo o parte de la SEC ID N° 1 se pueden usar para sondear ADNc o sondear bibliotecas genómicas de otras especies, tales como las descritas como fuentes para los polipéptidos de la invención.

También se pueden obtener homólogos de especies usando PCR degenerada, que usa cebadores diseñados para fijar como objetivo secuencias dentro de las variantes y homólogos que codifican secuencias de aminoácidos conservadas. Los cebadores pueden contener una o más posiciones degeneradas y se usarán en condiciones menos rigurosas que las usadas para clonar secuencias con cebadores de secuencias únicas frente a secuencias conocidas.

Alternativamente, dichos polinucleótidos se pueden obtener por mutagénesis dirigida al sitio de las secuencias de la sialidasa o variantes de las mismas. Esto puede ser útil en el caso de que se requiera, por ejemplo, que el codón silencioso cambie a secuencias para optimizar las preferencias del codón para una célula huésped particular en que se están expresando las secuencias de polinucleótidos. Se pueden hacer otros cambios de secuencias para introducir sitios de reconocimiento de enzimas de restricción o para modificar la propiedad o la función de los polipéptidos codificados por los polinucleótidos.

La invención incluye polinucleótidos bicatenarios que comprenden un polinucleótido de la invención y su complemento.

La presente invención también proporciona polinucleótidos que codifican los polipéptidos de la invención descritos anteriormente. Puesto que dichos polinucleótidos serán útiles como secuencias para producción recombinante de polipéptidos de la invención, no es necesario que puedan hibridar a la secuencia de la SEC ID N° 1 o SEC ID N° 2, aunque esto será deseable en general. De otro modo, dichos polinucleótidos puede ser etiquetados, usados y preparados como se describió anteriormente si se desea.

## 30 Polinucleótidos recombinantes

La invención también proporciona vectores que comprenden un polinucleótido de la invención, incluyendo vectores de clonación y expresión y en otro aspecto métodos de crecimiento, transformación o transfección de dichos vectores en una célula huésped adecuada, por ejemplo en condiciones en que tiene lugar la expresión de un polipéptido de, o codificado por una secuencia de, la invención. También se proporcionan células huésped que comprenden un polinucleótido o vector de la invención en el que el polinucleótido es heterólogo para el genoma de la célula huésped. El término "heterólogo", normalmente con respecto a la célula huésped, significa que el polinucleótido no se encuentra de manera natural en el genoma de la célula huésped o que el polipéptido no es producido de manera natural por esa célula. Preferiblemente, la célula huésped es una célula de levadura, por ejemplo una célula de levadura del género *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Hansenula* o *Saccharomyces* o una célula fúngica filamentosa, por ejemplo del género *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* o *Fusarium*.

## Vectores

El vector en que se inserta la casete de expresión de la invención puede ser cualquier vector que se pueda someter de manera conveniente a procedimientos de ADN recombinante y la elección del vector dependerá con frecuencia de la célula huésped en que se tiene que introducir. Así, el vector puede ser un vector de replicación de manera autónoma, es decir, un vector que existe como entidad extra-cromosómica, la replicación del cual es independiente de la replicación cromosómica, tal como un plásmido. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica junto con el cromosoma o cromosomas en que se ha integrado.

Preferiblemente, cuando un polinucleótido de la invención está en un vector se une de manera operable a una secuencia reguladora que es capaz de proporcionar la expresión de la secuencia codificadora por la célula huésped, es decir, el vector es un vector de expresión. El término "unido de manera operable" se refiere a una yuxtaposición en la que están los componentes descritos en una relación que les permite funcionar de su manera deseada. Una secuencia reguladora tal como un activador, potenciador u otra señal de regulación de la expresión "unida de manera operable" a una secuencia codificadora se dispone de tal manera que la expresión de la secuencia codificadora se consigue en condiciones de producción.

Los vectores se pueden proporcionar, por ejemplo en el caso de vectores de plásmido, cósmido, virus o fago, con un origen de replicación, opcionalmente para activar la expresión del polinucleótido y opcionalmente un potenciador y/o

un regulador del activador. Puede haber una secuencia terminadora, ya que puede haber una secuencia de poliadenilación. Los vectores pueden contener uno o más genes marcadores seleccionables, por ejemplo un gen de resistencia a la ampicilina en el caso de un plásmido bacteriano o un gen de resistencia a la neomicina para un vector de mamífero. Los vectores se pueden usar *in vitro*, por ejemplo para la producción de ARN o se pueden usar para transfectar o transformar una célula huésped.

La secuencia de ADN que codifica el polipéptido se introduce preferiblemente en un huésped adecuado como parte de una construcción de expresión en que la secuencia de ADN se une de manera operable a señales de expresión que son capaces de dirigir la expresión de la secuencia de ADN en las células huésped. Para la transformación del huésped adecuado con la transformación de la construcción de expresión están disponibles procedimientos que son conocidos para el experto. La construcción de expresión se puede usar para la transformación del huésped como parte de un vector que soporta un marcador seleccionable o la construcción de expresión se transforma conjuntamente como una molécula separada junto con el vector que soporta un marcador seleccionable. Los vectores pueden contener uno o más genes marcadores seleccionables.

Los marcadores seleccionables preferidos incluyen, pero no se limitan a, los que complementan un defecto en la célula huésped o confieren resistencia a un fármaco. Incluyen por ejemplo genes marcadores versátiles que se pueden usar para la transformación de la mayoría de los hongos filamentosos y las levaduras tales como genes de acetamidasa o ADNc (los genes *amdS*, *niaD*, *facA* o los ADNc de *A. nidulans*, *A. oryzae* o *A. niger*) o los genes que proporcionan resistencia a los antibióticos como resistencia a G418, higromicina, bleomicina, kanamicina, fleomicina o benomilo (*benA*). Alternativamente, se pueden usar marcadores de selección específicos tales como marcadores auxotróficos que requieren correspondientes cepas huésped mutantes: por ej., URA3 (de *S. cerevisiae* o genes análogos de otras levaduras), *pyrG* o *pyrA* (de *A. nidulans* o *A. niger*), *argB* (de *A. nidulans* o *A. niger*) o *trpC*. En una realización preferida, el marcador de selección se suprime de la célula huésped transformada después de la introducción de la construcción de expresión a fin de obtener células huésped transformadas capaces de producir el polipéptido que esté exento de genes marcadores de selección.

Otros marcadores incluyen ATP sintetasa subunidad 9 (*oliC*), orotidin-5'-fosfato Descarboxilasa (*pvrA*), el gen de resistencia a G418 bacteriana (útil en levadura, pero no en hongos filamentosos), el gen de resistencia a ampicilina (*E. coli*), el gen de resistencia a neomicina (*Bacillus*) y el gen *uidA* *E. coli*, que codifica la glucuronidasa (GUS). Los vectores se pueden usar *in vitro*, por ejemplo para la producción de ARN o para transfectar o transformar una célula huésped.

Para la mayoría de hongos filamentosos y levadura, la construcción de expresión se integra preferiblemente en el genoma de la célula huésped para obtener transformantes estables. Sin embargo, para ciertas levaduras también están disponibles sistemas de vector episomal adecuados en que la construcción de expresión se puede incorporar para expresión estable y de alto nivel. Ejemplos de los mismos incluyen vectores procedentes de los plásmidos CEN y pKD1 2  $\mu$ m, de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, respectivamente, o vectores que contienen una secuencia AMA (por ej., AMA1 de *Aspergillus*). Cuando las construcciones de expresión se integran en genomas de célula huésped, las construcciones se integran en sitios aleatorios en el genoma o en sitios diana predeterminados usando recombinación homóloga, en cuyo caso los sitios diana comprenden preferiblemente un gen altamente expresado. Un gen altamente expresado es un gen cuyo ARNm puede constituir al menos 0,01% (p/p) del ARNm celular total, por ejemplo en condiciones inducidas, o alternativamente, un gen cuyo producto génico puede constituir al menos 0,2% (p/p) de la proteína celular total, o, en caso de un producto génico segregado, se pueden segregar a un nivel de al menos 0,05 g/l.

Una construcción de expresión para una célula huésped determinada contendrá normalmente los siguientes elementos unidos de manera operable entre sí en orden consecutivo desde el extremo 5' al extremo 3' respecto a la cadena codificadora de la secuencia que codifica el polipéptido del primer aspecto: (1) una secuencia activadora capaz de dirigir la transcripción de la secuencia de ADN que codifica el polipéptido en la célula huésped determinada, (2) preferiblemente, una región no traducida 5' (líder), (3) opcionalmente, una secuencia señal capaz de dirigir la secreción del polipéptido de la célula huésped determinada en el medio de cultivo, (4) la secuencia de ADN que codifica una forma madura y preferiblemente activa del polipéptido y preferiblemente también (5) una región de terminación de la transcripción (terminadora) capaz de terminar la transcripción aguas abajo de la secuencia de ADN que codifica el polipéptido.

Aguas abajo de la secuencia de ADN que codifica el polipéptido, la construcción de expresión contiene preferiblemente una región no traducida 3' que contiene uno o más sitios de terminación de la transcripción, también referida como un terminador. El origen del terminador es menos crítico. El terminador puede ser por ejemplo natural para la secuencia de ADN que codifica el polipéptido. Sin embargo, preferiblemente se usa un terminador bacteriano en células huésped bacterianas, se usa un terminador de levadura en células huésped de levadura y se usa un terminador fúngico filamentoso en células huésped fúngicas filamentosas. Más preferiblemente, el terminador es endógeno para la célula huésped en que se expresa la secuencia de ADN que codifica el polipéptido.

La expresión mejorada del polinucleótido que codifica el polipéptido de la invención también se puede conseguir por la selección de regiones reguladoras heterólogas, por ej., activador, secuencia señal y regiones terminadoras, que sirven para aumentar la expresión y, si se desea, los niveles de secreción de la proteína de interés del huésped de

expresión elegido y/o para proporcionar el control inducible de la expresión del polipéptido de la invención.

Aparte del activador natural para el gen que codifica el polipéptido de la invención, se pueden usar otros activadores para dirigir la expresión del polipéptido de la invención. El activador se puede seleccionar por su eficacia en dirigir la expresión del polipéptido de la invención en el huésped de expresión deseado.

- 5 Los activadores/potenciadores y otras señales de regulación de la expresión se pueden seleccionar para que sean compatibles con la célula huésped para la que se diseña el vector de expresión. Por ejemplo, se pueden usar activadores procariotas, en particular los adecuados para uso en cepas *E. coli*. Cuando la expresión de los polipéptidos de la invención se realiza en células de mamífero, se pueden usar activadores de mamífero. También se pueden usar activadores específicos de tejidos, por ejemplo activadores específicos de células hepatocitos. También se pueden usar activadores víricos, por ejemplo la repetición terminal larga del virus de la leucemia murina Moloney (MMLV LTR, por sus siglas en inglés), el activador LTR del virus del sarcoma de rous (RSV), el activador SV40, el activador IE de citomegalovirus humano (CMV), activadores del virus del herpes simplex o activadores de adenovirus.

- 15 Los activadores de levadura adecuados incluyen los activadores GAL4 y ADH de *S. cerevisiae* y el activador nmt1 y adh de *S. pombe*. Los activadores de mamífero incluyen el activador de metalotioneína que se puede inducir como respuesta a los metales pesados tales como cadmio. También se pueden usar activadores víricos tales como el activador de antígeno T grande SV40 o activadores de adenovirus. Todos estos activadores están disponibles fácilmente en la técnica.

- 20 Se pueden usar activadores de mamífero, tales como activadores de  $\beta$ -actina. Se prefieren especialmente los activadores específicos de tejidos, en particular activadores específicos de células endoteliales o neuronales (por ejemplo los activadores DDAHI y DDAHII). También se pueden usar activadores víricos, por ejemplo la repetición terminal larga del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV LTR), el activador LTR del virus del sarcoma de rous (RSV), el activador SV40, el activador IE de citomegalovirus humano (CMV), adenovirus, activadores de HSV (tales como los activadores de HSV IE) o activadores de HPV, en particular la región reguladora aguas arriba de HPV (URR). Los activadores víricos están disponibles fácilmente en la técnica.

- 25 Se puede usar una variedad de activadores que son capaces de dirigir la transcripción en las células huésped de la invención. Preferiblemente, la secuencia activadora procede de un gen altamente expresado como se definió previamente. Ejemplos de genes altamente expresados preferidos de los que proceden los activadores preferiblemente y/o que están comprendidos en sitios diana predeterminados preferidos para integración de construcciones de expresión, incluyen pero no se limitan a genes que codifican enzimas glicólicas tales como triosa-fosfato isomerasas (TPI), gliceraldehído-fosfato deshidrogenasas (GAPDH), fosfoglicerato cinasas (PGK), piruvato cinasas (PYK), alcohol deshidrogenasas (ADH), así como genes que codifican amilasas, glucoamilasas, proteasas, xilanasas, celobiohidrolasas,  $\beta$ -galactosidasas, alcohol (metanol) oxidasas, factores de elongación y proteínas ribosomales. Ejemplos específicos de genes altamente expresados adecuados incluyen por ej., el gen LAC4 de *Kluyveromyces* sp., los genes metanol oxidasa (AOX y MOX) de *Hansenula* y *Pichia*, respectivamente, los genes glucoamilasa (glaA) de *A. niger* y *A. awamori*, el gen TAKA-amilasa de *A. oryzae*, el gen gpdA de *A. nidulans* y los genes de celobiohidrolasa de *T. reesei*.

- 40 Ejemplos de activadores fuertes constitutivos y/o inducibles que son preferidos para uso en huéspedes de expresión fúngicos son los que se pueden obtener de los genes fúngicos para activadores de xilanasas (xlnA), fitasa, ATP-sintetasa subunidad 9 (oliC), triosa fosfato isomerasa (tpi), alcohol deshidrogenasa (AdhA), amilasa (amy), amiloglicosidasa (AG -del gen glaA), acetamidasa (amdS) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (gpd).

Ejemplos de activadores fuertes de levadura que se pueden usar incluyen los que se pueden obtener de los genes para alcohol deshidrogenasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, lactasa, 3-fosfoglicerato cinasa, ATPasa de membrana plasmática (PMA1) y triosafosfato isomerasa.

- 45 Ejemplos de activadores fuertes bacterianos que se pueden usar incluyen los activadores de amilasa y SPo2 así como activadores de genes de proteasa extracelulares.

Activadores adecuados para células de plantas que se pueden usar incluyen activadores de napalina sintasa (nos), octopina sintasa (ocs), manopina sintasa (mas), subunidad pequeña de ribulosa (rubisco ssu), histona, actina del arroz, faseolina, virus del mosaico de la coliflor (CMV) 35S y 19S y circovirus.

- 50 El vector puede incluir además secuencias que flanquean el polinucleótido dando lugar a ARN que comprende secuencias homólogas a las de secuencias genómicas eucariotas, preferiblemente secuencias genómicas fúngicas, o secuencias genómicas de levaduras. Esto permitirá la introducción de los polinucleótidos de la invención en el genoma de hongos o levaduras por recombinación homóloga. En particular, se puede usar un vector plásmido que comprenda la casete de expresión flanqueada por secuencias fúngicas para preparar un vector adecuado para suministrar los polinucleótidos de la invención a una célula fúngica. Las técnicas de transformación usando estos vectores fúngicos son conocidas para los expertos en la materia.

El vector puede contener un polinucleótido de la invención orientado en una dirección antisentido para proporcionar la producción de ARN antisentido. Esto se puede usar para reducir, si se desea, los niveles de expresión del polipéptido.

## Células huésped y expresión

En un aspecto más la invención proporciona un procedimiento para preparar un polipéptido de la invención que comprende cultivar una célula huésped transformada o transinfectada con un vector de expresión como se describió anteriormente en condiciones adecuadas para expresión por el vector de una secuencia codificadora que codifica el polipéptido y recuperar el polipéptido expresado. Los polinucleótidos de la invención se pueden incorporar a un vector replicable recombinante, tal como un vector de expresión. El vector se puede usar para replicar el ácido nucleico en una célula huésped compatible. Así en una realización más, la invención proporciona un método para preparar un polinucleótido de la invención introduciendo un polinucleótido de la invención en un vector replicable, introduciendo el vector en una célula huésped compatible y cultivando la célula huésped en condiciones que ocasionen la replicación del vector. Las células huésped adecuadas incluyen bacterias tales como *E. coli*, levadura, estirpes celulares de mamífero y otras estirpes celulares eucariotas, por ejemplo células de insecto tales como células Sf9 y células fúngicas (por ej., filamentosas).

Preferiblemente, el polipéptido se produce como una proteína segregada en cuyo caso la secuencia de ADN que codifica una forma madura del polipéptido en la construcción de expresión puede estar unida de manera operable a una secuencia de ADN que codifica una secuencia señal. En el caso en que el gen que codifica la proteína segregada presente en la cepa natural una secuencia señal preferiblemente la secuencia señal usada será natural (homóloga) para la secuencia de ADN que codifica el polipéptido. Alternativamente, la secuencia señal es extraña (heteróloga) para la secuencia de ADN que codifica el polipéptido, en cuyo caso la secuencia señal es preferiblemente endógena para la célula huésped en que se expresa la secuencia de ADN. Ejemplos de secuencias señal adecuadas para células huésped de levadura son las secuencias señal procedentes de genes MFalfa de levadura. De manera similar, una secuencia señal adecuada para células huésped fúngicas filamentosas es por ej., una secuencia señal procedente de un gen de amiloglucosidasa fúngica filamentosa (AG), por ej., el gen *glaA* de *A. niger*. Esta secuencia señal se puede usar junto con el propio activador de la amiloglucosidasa (también denominada (gluco) amilasa), así como junto con otros activadores. También se pueden usar secuencias señal híbridas dentro del contexto de la presente invención.

Las secuencias líder de secreción heteróloga preferidas son las que se originan del gen de amiloglucosidasa (AG) fúngico (*glaA* – ambas versiones de los aminoácidos 18 y 24 por ej., de *Aspergillus*), el gen MFalfa (levaduras por ej., *Saccharomyces*, *Pichia* y *Kluyveromyces*) o el gen alfa-amilasa (*Bacillus*).

Los vectores se pueden transformar o transinfectar en una célula huésped adecuada como se describió anteriormente para proporcionar la expresión de un polipéptido de la invención. Este procedimiento puede comprender cultivar una célula huésped transformada con un vector de expresión como se describió anteriormente en condiciones adecuadas para expresión del polipéptido y opcionalmente recuperar el polipéptido expresado.

Un aspecto más de la invención proporciona así células huésped transformadas o transinfectadas con o que comprenden un polinucleótido o vector de la invención. Preferiblemente, el polinucleótido es soportado en un vector que permite la replicación y expresión del polinucleótido. Las células se elegirán que sean compatibles con dicho vector y pueden ser por ejemplo células procariontas (por ejemplo bacterianas) o fúngicas eucariotas, de levadura o plantas.

La invención incluye procedimientos para la producción de un polipéptido de la invención mediante expresión recombinante de una secuencia de ADN que codifica el polipéptido. Para este fin, la secuencia de ADN de la invención se puede usar para multiplicación de genes y/o intercambio de señales de expresión, tales como activadores, secuencias de señales de secreción, para permitir la producción económica del polipéptido en una célula huésped homóloga o heteróloga adecuada. Una célula huésped homóloga se define en la presente memoria como una célula huésped que es de la misma especie o que es una variante dentro de la misma especie que la especie de la que procede la secuencia de ADN.

Las células huésped adecuadas son preferiblemente microorganismos procariontas tales como bacterias, o más preferiblemente organismos eucariotas, por ejemplo hongos, tales como células de levaduras u hongos filamentosos o plantas. En general, se prefieren células de levadura sobre células fúngicas filamentosas debido a que son más fáciles de manipular. Sin embargo, algunas proteínas son segregadas de manera deficiente de las levaduras, o en algunos casos no se tratan adecuadamente (por ej., hiperglucosilación en levadura). En estos casos, se debería seleccionar un organismo huésped fúngico filamentoso.

Las bacterias del género *Bacillus* son muy adecuadas como huésped heterólogo debido a su capacidad para segregar proteínas en el medio de cultivo. Otras bacterias adecuadas como huéspedes son las de los géneros *Streptomyces* y *Pseudomonas*. Una célula huésped de levadura preferida para la expresión de la secuencia de ADN que codifica el polipéptido es una del género *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Yarrowia*, o *Schizosaccharomyces*. Más preferiblemente, una célula de levadura huésped se selecciona del grupo que consiste en las especies *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* (también conocida como *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*), *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica*, y *Schizosaccharomyces pombe*.

Lo más preferido para la expresión de la secuencia de ADN que codifica el polipéptido son, sin embargo, células

huésped fúngicas filamentosas. Las células huésped fúngicas filamentosas preferidas se seleccionan del grupo que consiste en los géneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Disporotrichum*, *Penicillium*, *Acremonium*, *Neurospora*, *Thermoascus*, *Myceliophthora*, *Sporotrichum*, *Thielavia* y *Talaromyces*. Más preferiblemente una célula huésped fúngica filamentosa es de especie *Aspergillus ozyae*, *Aspergillus sojae* o *Aspergillus nidulans* o es de una especie del Grupo *Aspergillus niger* (como se define por Raper y Fennell, El Género *Aspergillus*, The Williams & Wilkins Company, Baltimore, págs. 293-344, 1.965). Estas incluyen, pero no se limitan a, *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus tubigenensis*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus ficuum* y también las de las especies *Trichoderma reesei*, *Fusarium graminearum*, *Penicillium chrysogenum*, *Acremonium alabamense*, *Neurospora crassa*, *Myceliophthora thermophilum*, *Sporotrichum cellulophilum*, *Disporotrichum dimorphosporum* y *Thielavia terrestris*.

Ejemplos de huéspedes de expresión preferidos dentro del alcance de la presente invención son hongos tales como la especie *Aspergillus* (en particular las descritas en las patentes europeas EP-A-184.438 y EP-A-284.603) y la especie *Trichoderma*; bacterias tales como la especie *Bacillus* (en particular las descritas en las patentes europeas EP-A-134.048 y EP-A-253.455), especialmente las especies *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Pseudomonas* y levaduras tales como las especies *Kluyveromyces* (en particular las descritas en la patente europea EP-A-096.430 tales como *Kluyveromyces lactis* y en la patente europea EP-A-301.670) y la especie *Saccharomyces*, tal como *Saccharomyces cerevisiae*.

Las células huésped según la invención incluyen células de plantas y la invención se extiende por lo tanto a organismos transgénicos, tales como plantas y partes de las mismas, que contienen una o más células de la invención. Las células pueden expresar de manera heteróloga el polipéptido de la invención o pueden contener de manera heteróloga uno o más de los polinucleótidos de la invención. La planta transgénica (o modificada genéticamente) puede presentar por lo tanto insertada (típicamente de manera estable) en su genoma una secuencia que codifica los polipéptidos de la invención. La transformación de las células de plantas se puede realizar usando técnicas conocidas, por ejemplo usando un plásmido Ti o Ri de *Agrobacterium tumefaciens*. El plásmido (o vector) puede contener así secuencias necesarias para infectar una planta y se pueden emplear derivados de los plásmidos Ti y/o Ri.

La célula huésped puede sobreexpresar el polipéptido y las técnicas para lograr por ingeniería sobre-expresión son conocidas y se pueden usar en la presente invención. El huésped puede presentar así dos o más copias del polinucleótido.

Alternativamente, se puede efectuar la infección directa de una parte de una planta tal como una hoja, raíz o tallo. En esta técnica, la planta que se tiene que infectar puede ser herida, por ejemplo cortando la planta con una cuchilla, perforando la planta con una aguja o frotando la planta con un abrasivo. La herida se inocula después con el *Agrobacterium*. Después se puede cultivar la planta o parte de la planta en un medio de cultivo adecuado y permitir que se desarrolle en una planta madura. La regeneración de células transformadas en plantas modificadas de manera genética se puede conseguir usando técnicas conocidas, por ejemplo seleccionando brotes transformados usando un antibiótico y por subcultivo de los brotes en un medio que contenga los nutrientes apropiados, hormonas de la planta y similares.

Cultivo de células huésped y producción recombinante.

La invención también incluye células que se han modificado para expresar la sialidasa o una variante de la misma. Dichas células incluyen estirpes celulares transitorias, o preferiblemente eucariotas superiores modificadas de manera estable, tales como células de mamífero o células de insecto, células eucariotas inferiores, tales como células de levadura y fúngicas filamentosas o células procariotas tales como células bacterianas.

También es posible que los polipéptidos de la invención se expresen de manera en una estirpe celular o en una membrana, tales como por ejemplo en un sistema de expresión de baculovirus. Dichos sistemas, que se adaptan para expresar las proteínas según la invención, también se incluyen dentro del alcance de la presente invención.

Según la presente invención, la producción del polipéptido de la invención se puede efectuar por el cultivo de huéspedes de expresión microbianos, que se han transformado con uno o más polinucleótidos de la presente invención, en un medio de fermentación con nutriente convencional.

Las células huésped recombinantes según la invención se pueden cultivar usando procedimientos conocidos en la técnica. Para cada combinación de un activador y una célula huésped, están disponibles condiciones de cultivo que conducen a la expresión de la secuencia de ADN que codifica el polipéptido. Después de alcanzar la densidad celular deseada o título del polipéptido se detiene el cultivo y se recupera el polipéptido usando procedimientos conocidos.

El medio de fermentación puede comprender un medio de cultivo conocido que contiene una fuente de carbono (por ej., glucosa, maltosa, molasas, etc.), una fuente de nitrógeno (por ej., sulfato de amonio, nitrato de amonio, cloruro de amonio, etc.), una fuente de nitrógeno orgánico (por ej., extracto de levadura, extracto de malta, peptona, etc.) y fuentes de nutrientes inorgánicos (por ej., fosfato, magnesio, potasio, cinc, hierro, etc.). Opcionalmente, se puede incluir un inductor (dependiendo de la construcción de expresión usada) o añadirse con posterioridad.

La selección del medio apropiado puede estar basada en la elección de huésped de expresión y/o basada en los requerimientos de regulación de la construcción de expresión. Los medios adecuados son conocidos para los expertos en la materia. El medio puede contener, si se desea, componentes adicionales que favorezcan los huéspedes de expresión transformados sobre otros microorganismos potencialmente contaminantes.

- 5 La fermentación se puede realizar durante un periodo de 0,5-30 días. La fermentación puede ser un procedimiento por lotes, continuo o alimentado, a una temperatura adecuada en el intervalo de entre 0°C y 45°C y, por ejemplo, a un pH de 2 a 10. Las condiciones de fermentación preferidas incluyen una temperatura en el intervalo de entre 20°C y 37 °C y/o un pH entre 3 y 9. Las condiciones apropiadas se seleccionan normalmente en base a la elección del huésped de expresión y la proteína que se tiene que expresar.
- 10 Después de fermentación, si es necesario, se pueden retirar las células del caldo de fermentación mediante centrifugación o filtración. Después de que se ha detenido la fermentación o después de eliminación de las células, se puede recuperar después el polipéptido de la invención y, si se desea, purificar y aislar por medios convencionales. La sialidasa de la invención se puede purificar de micelio fúngico o del caldo de cultivo en que se libera la sialidasa por las células fúngicas cultivadas.
- 15 En una realización preferida, el polipéptido producido de un hongo, más preferiblemente de un *Aspergillus*, lo más preferiblemente de *Aspergillus niger*.

#### Modificaciones

- Los polipéptidos de la invención pueden ser modificados químicamente, por ej., modificados post-traduccionalmente. Por ejemplo, pueden ser glicosilados (una o más veces) o comprender restos aminoácido modificados. También se pueden modificar por adición de restos histidina para ayudar a su purificación o por adición de una secuencia señal para activar la secreción de la célula. El polipéptido puede presentar extensiones amino- o carboxil-terminales, tales como un resto metionina amino-terminal, un pequeño péptido ligador de hasta aproximadamente 20-25 restos, o una pequeña extensión que facilite la purificación, tal como un tracto de poli-histidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión.

- 25 Un polipéptido de la invención puede estar etiquetado con una etiqueta reveladora. La etiqueta reveladora puede ser cualquier etiqueta adecuada que permita que se detecte el polipéptido. Las etiquetas adecuadas incluyen radioisótopos, por ej., <sup>125</sup>I, <sup>35</sup>S, enzimas, anticuerpos, polinucleótidos y ligadores tales como biotina.

- Los polipéptidos se pueden modificar para que incluyan aminoácidos que no se encuentran en la naturaleza o para aumentar la estabilidad del polipéptido. Cuando las proteínas o los péptidos se producen por medios sintéticos, dichos aminoácidos se pueden introducir durante la producción. Las proteínas o los péptidos también se pueden modificar después de producción sintética o recombinante.

- Los polipéptidos de la invención también se pueden producir usando D-aminoácidos. En tales casos los aminoácidos se ligarán en secuencia inversa en la orientación de C a N. Esto es convencional en la técnica para producir dichas proteínas o péptidos.

- 35 Se conoce una serie de modificaciones de cadenas laterales en la técnica y se pueden hacer para las cadenas laterales de las proteínas o los péptidos de la presente invención. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, modificaciones de aminoácidos por alquilación reductora por reacción con un aldehído seguido por reducción con NaBH<sub>4</sub>, amidinación con metilacetimidato o acilación con anhídrido acético.

- Las secuencias proporcionadas por la presente invención también se pueden usar como materiales de partida para la construcción de enzimas de "segunda generación". Sialidasas de "segunda generación" son sialidasas, modificadas por técnicas de mutagénesis (por ej., mutagénesis dirigida al sitio o técnicas de transposición genética), que presentan propiedades que difieren de las de sialidasa natural o sialidasa recombinante tales como las producidas por la presente invención. Por ejemplo, su temperatura o pH óptimo, actividad específica, afinidad del sustrato o termoestabilidad se pueden modificar de manera que sean más adecuados para su uso en un procedimiento particular.

- Los aminoácidos esenciales para la actividad de la sialidasa de la invención y por lo tanto sometidos preferiblemente a sustitución, se pueden identificar según procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de barrido con alanina. En la última técnica se introducen mutaciones en cada resto en la molécula y se ensaya en las moléculas mutantes resultantes su actividad biológica (por ej., actividad sialidasa) para identificar restos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula. También se pueden determinar sitios de interacción enzima-sustrato por análisis de estructura del cristal cuando se determina por técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía o etiquetado de fotoafinidad.

Las técnicas de transposición genética proporcionan una manera aleatoria de introducir mutaciones en una secuencia de polinucleótidos. Después de expresión los aislados con las mejores propiedades se vuelven a aislar, se combinan

5 y se transponen de nuevo para aumentar la diversidad genética. Repitiendo este procedimiento un número de veces, se pueden aislar genes que codifiquen proteínas mejoradas de manera más rápida. Preferiblemente, el procedimiento de transposición genética empieza con una familia de genes que codifica proteínas con una función similar. La familia de secuencias de polinucleótidos proporcionadas con esta invención sería apta para transposición genética para mejorar las propiedades de sialidasas segregadas.

10 Se pueden usar técnicas de mutagénesis aleatoria alternativamente clásicas y selección tales como mutagénesis con tratamiento NTG o mutagénesis UV, para mejorar las propiedades de una proteína. La mutagénesis se puede realizar directamente sobre ADN aislado, o sobre células transformadas con el ADN de interés. Alternativamente, se pueden introducir mutaciones en ADN aislado por una serie de técnicas que son conocidas para el experto en la materia. Ejemplos de estos métodos son PCR con predisposición a errores, multiplicación de ADN plasmídico en una célula huésped deficiente en reparación, etc.

15 Se espera que el uso de células huésped de levadura y fúngicas filamentosas proporcione modificaciones post-traduccionales (por ej., tratamiento proteolítico, miristilación, glucosilación, truncamiento y fosforilación de tirosina, serina o treonina) como se puede requerir para conferir actividad biológica óptima sobre productos de expresión recombinantes de la invención.

#### Preparaciones

20 Los polipéptidos de la invención pueden estar en una forma aislada. Se entenderá que el polipéptido se puede mezclar con portadores o diluyentes que no interfieran con el fin deseado del polipéptido y aún se considere como aislado. Un polipéptido de la invención también puede estar en una forma sustancialmente purificada, en cuyo caso comprenderá en general el polipéptido en una preparación en que más de 70%, por ej., más de 80%, 90%, 95%, 98% o 99% de la proteínas en la preparación es un polipéptido de la invención.

Los polipéptidos de la invención se pueden proporcionar en una forma tal que estén fuera de su entorno celular natural. Así, se pueden aislar o purificar sustancialmente, como se discutió anteriormente, o en una célula en que no se encuentra por naturaleza, por ejemplo una célula de otra especie fúngica, animales, plantas o bacterias.

25 Eliminación o reducción de actividad sialidasa.

La presente invención también se refiere a métodos para producir una célula mutante de una célula precursora, que comprende romper o suprimir la secuencia de ácidos nucleicos endógena que codifica el polipéptido o una secuencia de control de los mismos, que da como resultado que la célula mutante produzca menos del polipéptido que la célula precursora.

30 La construcción de cepas que presentan actividad sialidasa reducida se puede llevar a cabo de manera conveniente por modificación o inactivación de una secuencia de ácidos nucleicos necesaria para expresión de la sialidasa en la célula. La secuencia de ácidos nucleicos que se tiene que modificar o inactivar puede ser, por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos que codifique el polipéptido o una parte del mismo esencial para que presente actividad sialidasa o la secuencia de ácidos nucleicos puede presentar una función reguladora requerida para la expresión del polipéptido de la secuencia codificadora de la secuencia de ácidos nucleicos. Un ejemplo de dicha secuencia reguladora o de control puede ser una secuencia promotora o una parte funcional de la misma, es decir, una parte que sea suficiente para afectar a la expresión del polipéptido. Otras secuencias de control para posible modificación incluyen, pero no se limitan a, una secuencia líder, una secuencia de poliadenilación, una secuencia de propéptidos, una secuencia señal y una secuencia de terminación.

40 La modificación o inactivación de la secuencia de ácidos nucleicos se puede realizar sometiendo la célula a mutagénesis y seleccionando células en que se haya reducido o eliminado la sialidasa que produce capacidad. La mutagénesis, que puede ser específica o aleatoria, se puede realizar, por ejemplo, por el uso de un agente mutagenizante físico o químico adecuado o sometiendo la secuencia de ADN a mutagénesis por PCR. Además, la mutagénesis se puede realizar por el uso de cualquier combinación de estos agentes mutagenizantes.

45 Ejemplos de un agente mutagenizante físico o químico adecuado para el presente fin incluyen irradiación ultravioleta (UV), hidroxilamina, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG), O-metilhidroxilamina, ácido nitroso, metanosulfonato de etilo (EMS), bisulfito sódico, ácido fórmico y análogos de nucleótidos.

50 Cuando se usan dichos agentes, la mutagénesis se realiza típicamente incubando la célula que se tiene que mutagenizar en presencia del agente mutagenizante de elección en condiciones adecuadas y seleccionando células que expresan actividad sialidasa reducida o ninguna.

55 La modificación o inactivación de producción de un polipéptido de la presente invención se puede llevar a cabo por la introducción, sustitución o eliminación de uno o más nucleótidos en la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido o un elemento regulador requerido para la transcripción o traducción de los mismos. Por ejemplo, se pueden insertar o retirar nucleótidos de manera que de cómo resultado la introducción de un codón de parada, la eliminación del codón de inicio, o un cambio del marco de lectura abierto. Dicha modificación o inactivación se puede llevar a cabo por mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis por PCR según métodos conocidos en la técnica.

Aunque, en principio, la modificación se puede realizar *in vivo*, es decir, directamente sobre la célula que expresa la secuencia de ácidos nucleicos que se tiene que modificar, se prefiere que la modificación se realice *in vitro* como se ejemplifica a continuación.

5 Un ejemplo de una manera conveniente para inactivar o reducir la producción de la sialidasa por una célula huésped de elección se basa en técnicas de sustitución génica o interrupción génica. Por ejemplo, en el método de interrupción génica, una secuencia de ácidos nucleicos que corresponde al gen o fragmento de gen endógeno de interés se mutageniza *in vitro* para producir una secuencia de ácidos nucleicos defectuosa que se transforma después en la célula huésped para producir un gen defectuoso. Por recombinación homóloga, la secuencia de ácidos nucleicos defectuosa reemplaza al gen o fragmento de gen endógeno. Preferiblemente, el gen o fragmento de gen defectuoso también codifica al marcador que se puede usar para seleccionar transformantes en que se ha modificado o destruido el gen que codifica el polipéptido.

15 Alternativamente, la modificación o inactivación de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido de la presente invención se puede conseguir por técnicas antisentido establecidas usando una secuencia de nucleótidos complementaria para la secuencia codificadora del polipéptido. Más específicamente, la producción del polipéptido por una célula se puede reducir o eliminar introduciendo una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido. El polinucleótido antisentido se transcribirá entonces típicamente en la célula y será capaz de hibridar el ARNm que codifica la sialidasa. En condiciones que permiten la secuencia de nucleótidos antisentido complementaria para hibridar al ARNm, la cantidad de la sialidasa producida en la célula se reducirá o se eliminará.

20 Se prefiere que la célula que se tiene que modificar según los métodos de la presente invención sea de origen microbiano, por ejemplo, una cepa fúngica que sea adecuada para la producción de los productos proteicos deseados, homólogos o heterólogos a la célula.

25 La presente invención se refiere además a una célula mutante de una célula precursora que comprende una ruptura molecular o supresión de la secuencia de ácidos nucleicos endógena que codifica el polipéptido o una secuencia de control de los mismos, que da como resultado la célula mutante que produce menos del polipéptido que la célula precursora.

30 Las células mutantes deficientes en polipéptido así creadas son útiles en particular como células huésped para la expresión de polipéptidos homólogos y/o heterólogos. Por lo tanto, la presente invención se refiere además a métodos para producir un polipéptido homólogo o heterólogo que comprende (a) cultivar la célula mutante en condiciones propicias para la producción del polipéptido y (b) recuperar el polipéptido. En el presente contexto, el término " polipéptidos heterólogos" se define en la presente memoria como polipéptidos que no son naturales para la célula huésped, una proteína natural en que se han hecho modificaciones para modificar la secuencia natural o una proteína natural cuya expresión se modifique de manera cuantitativa como resultado de una manipulación de la célula huésped por técnicas de ADN recombinante.

35 En un aspecto más incluso, la presente invención proporciona un método para producir un producto proteínico esencialmente exento de actividad sialidasa por fermentación de una célula que produce tanto un polipéptido de sialidasa de la presente invención como el producto proteínico de interés. El método comprende añadir una cantidad eficaz de un agente capaz de inhibir la actividad sialidasa al caldo de fermentación durante o después de que se haya completado la fermentación, recuperar el producto de interés del caldo de fermentación y opcionalmente someter el producto recuperado a más purificación. Alternativamente, después de cultivo el caldo de cultivo resultante se puede someter a un pH o tratamiento de temperatura para reducir la actividad sialidasa sustancialmente y permitir la recuperación del producto del caldo de cultivo. El tratamiento de pH o temperatura combinados se puede realizar sobre una preparación de proteínas del caldo de cultivo.

45 Los métodos de la presente invención para producir un producto esencialmente sin sialidasa es de particular interés en la producción de polipéptidos eucariotas, en particular en la producción de proteínas fúngicas tales como enzimas. Las células deficientes en sialidasa también se pueden usar para expresar proteínas heterólogas de interés para la industria alimentaria o de interés farmacéutico.

Elaboración de queso y coagulación de la leche.

50 La coagulación es una etapa esencial en la producción tradicional de queso a partir de una composición láctea tales como leche bovina. La coagulación puede empezar por acidificación y/o la adición de una enzima (coagulante) tal como quimosina. Después de la coagulación, la leche se separa en cuajada y suero lácteo. La cuajada se procesa además a queso.

55 Los procedimientos de fabricación de queso a partir de diversas fuentes de leche se conocen desde hace tiempo y se han descrito con detalle para muchos tipos diferentes de variantes de queso. (véase por ej., Cheese : Chemistry, Physics and Microbiology, Vol 1&2, 1.999, Ed. Fox, Aspen Publications, Gaithersburg, Maryland; Encyclopedia of Dairy Sciences Vol 1-4, 2.003, Academic Press, Londres). Un punto crucial en la fabricación de queso es el procedimiento de coagulación, en que la solubilidad de las micelas y submicelas de caseína disminuye. Se usa muy comúnmente la coagulación inducida por enzima. Se han descrito enzimas como la quimosina de ternera,

equivalentes microbianos de quimosina y otras enzimas de otras fuentes y varias están disponibles con diversos nombres comerciales. Todas ellas se pueden usar para iniciar el procedimiento de coagulación. Esta etapa primaria en la coagulación es la escisión del enlace Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub> en  $\kappa$ -caseína. Esto conduce a la eliminación de la parte C-terminal de la  $\kappa$ -caseína: el glucomacropéptido (GMP). La eliminación del GMP conduce a la asociación de las micelas de caseína, es decir, coagulación de caseína. La coagulación de caseína conduce a formación de gel y el tiempo requerido para obtener gelificación en una composición láctea particular está relacionado directamente con la actividad del coagulante.

El tiempo que pasa entre la adición del coagulante y la aparición de floculación inicial de caseína se define como el tiempo de coagulación. La velocidad a que se forma el gel en leche de queso y la compactación del gel depende estrechamente de la cantidad de enzima añadida, la concentración de iones calcio, fósforo, temperatura y el pH. Después de la coagulación inicial, se forma un gel y la consistencia del gel aumenta después de un incremento en los enlaces intermicelares. Las micelas se mueven juntas y el coágulo se contrae, expulsándose de ese modo el suero lácteo. Este fenómeno es conocido como sinéresis y se acelera cortando la cuajada, aumentando la temperatura y aumentando la acidez producida por las bacterias de ácido láctico desarrolladas.

El tiempo entre la adición de coagulante y el principio de cortarse el gel para iniciar la sinéresis se referirá en el resto de este texto como tiempo de cuajado. El tiempo de cuajado es constante para una variedad de queso particular en una fábrica de elaboración de queso específica, aunque pueden tener lugar pequeñas variaciones (hasta 5-10%) como resultado de cambios en la calidad de, *por ej.*, la leche o el coagulante. En muchas fábricas de elaboración de queso, el tiempo de cuajado es la etapa limitante del tiempo en el procedimiento. Cuando se reduce el tiempo de cuajado, la fábrica puede tratar más leche a cuajada, que se trata además a queso. Una reducción en el tiempo de cuajado es por lo tanto de interés económico y hay necesidad de dicho tiempo de cuajado reducido.

El tiempo de cuajado se puede reducir de diversas formas, tales como un aumento en el coagulante añadido, disminución del pH de la leche o niveles aumentados de cloruro de calcio añadido. Estas soluciones, sin embargo, no se usan extensamente en la industria de elaboración del queso debido a que afecta de manera negativa a la calidad del queso. Los niveles aumentados de coagulante con frecuencia conducen a la formación de sabor más amargo como resultado de actividades de las proteasas no equilibradas. Una reducción en el pH de la leche conduce a una cuajada que es de inferior calidad y con frecuencia conduce a pérdidas de rendimiento. Aumentar las concentraciones en cloruro de calcio afecta de manera negativa al sabor y con frecuencia está limitado por la legislación. No hay un método disponible en la actualidad para reducir el tiempo de cuajado sin efectos secundarios negativos.

La estabilidad de las micelas de caseína contra la agregación es de crucial importancia en el proceso de agregación. La  $\kappa$ -caseína desempeña una función crucial en la estabilización de micelas de caseína. Las partes C-terminales hidrófilas y cargadas negativamente de cadenas de  $\kappa$ -caseína situadas en la superficie de la micela son responsables del impedimento estérico y la repulsión electrostática que evita la coagulación de caseína micelar (Minkiewicz *et al.*, Pol J Food Nutr Sci (1.993) 243, 39-48). La  $\kappa$ -caseína es una glucoproteína que contiene restos ácido siálico en posiciones conocidas (Cases *et al.*, J Food Sci (2.003) 68, 2.406-2.410; Fournet *et al.*, Biochim Biophys Acta (1.979) 576, 339-346). Se sabe que hay una micro-heterogeneidad en la población de  $\kappa$ -caseína basándose en diferencias en glucosilación y contenido en ácido siálico (Robitaille *et al.*, Food Res Int (1.995) 28, 17-21; Robitaille *et al.*, J Dairy Res (1.991) 58, 107-114). Diversos estudios describen el efecto de eliminación de restos ácido siálico usando la sialidasa procedente de *Clostridium perfringens*. Los parámetros que se examinaron son la estabilidad de la micela de caseína frente a la degradación por calor y por quimosina. Gibbons *et al.* (Biochim Biophys Acta (1.962) 56, 354-356) usaron disoluciones de  $\kappa$ -caseína purificada y mostraron que la eliminación de restos ácido siálico no afecta a la acción de la quimosina sobre  $\kappa$ -caseína. Vreeman *et al.*, (Biochem J (1.986) 240, 87-97) compararon el comportamiento cinético de la quimosina a fracciones de  $\kappa$ -caseína purificada con o sin glucosilación y encontraron que la  $\kappa$ -caseína desglucosilada es un sustrato mejor para la quimosina. También, Minkiewicz *et al.* (Pol J Food Nutr Sci (1.993), 243, 39-48) usando un sistema de micela de caseína reconstituida artificial, mostraron que los restos ácido siálico están contribuyendo a la estabilidad por calor de micelas de caseína, que se confirmó más adelante por Robitaille *et al.*, (Food Res Int (1.995) 28, 17-21). En un estudio separado, Robitaille *et al.* (Food Res Int (1.993) 26, 365-369) mostraron que la eliminación de restos ácido siálico de  $\kappa$ -caseína no tiene efecto significativo sobre el tiempo de coagulación pero que disminuye la firmeza de la cuajada. No se ha descrito un procedimiento de elaboración de queso con un tiempo de cuajado reducido pero con propiedades del queso inalteradas y esto sigue siendo una necesidad industrial.

Una reciente solicitud de patente europea (EP1370146) describe un procedimiento en que se usan glucosidasas únicas, incluyendo N-acetilneuraminidasa para coagular la leche. En la configuración descrita, no se usa coagulante de enzima. La omisión del coagulante abre la manera para los procedimientos de elaboración de queso alternativos pero no es un procedimiento atractivo para los procedimientos de elaboración de queso tradicionales debido a que el coagulante es una parte importante del sistema proteolítico en el queso que conduce a la formación de compuestos de sabor característicos (véase *por ej.*, Cheese : Chemistry, Physics and Microbiology, Vol 1&2, 1.999, Ed. Fox, Aspen Publications, Gathersburg, Maryland; Encyclopedia of Dairy Sciences Vol 1-4, 2.003, Academic Press, Londres para referencias sobre la función de la quimosina en la formación de sabor del queso).

En el presente contexto, el término "queso" se refiere a cualquier clase de queso tal como por *ej.*, queso natural,

análogos de queso y queso procesado. El queso se puede obtener por cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica tal como *por ej.*, por coagulación enzimática de una composición láctea con cuajo, o por coagulación ácida de una composición láctea con un ácido de calidad alimentaria o ácido producido por crecimiento bacteriano de ácido láctico. En una realización, el queso es queso cuajado con cuajo. La composición láctea puede ser sometida a un procedimiento de elaboración de queso convencional. El queso procesado se fabrica preferiblemente a partir de queso natural o análogos de queso por cocción y emulsificación del queso, tal como con sales emulsionantes (por ej., fosfatos y citrato). El procedimiento puede incluir además la adición de especias/condimentos.

El término “análogos de queso” se refiere a productos similares a queso que contienen grasa (tales como *por ej.*, grasa láctea (por ej., nata) como parte de la composición y que contienen además, como parte de la composición, un constituyente no lácteo, tal como por ej., aceite vegetal. El queso comprende todas las variedades de queso, tales como queso blando, queso semi-curado y queso curado. En fabricación de queso, la coagulación de una composición láctea se realiza preferiblemente por cuajo o por acidificación sólo dando como resultado requesón con cuajo y cuajada ácida, respectivamente. Las cuajadas ácidas frescas se refieren a esas variedades de queso producidas por la coagulación de leche, nata o suero lácteo por acidificación o una combinación de ácido y calor y que están listas para consumo una vez que está completada la fabricación sin maduración. Las cuajadas ácidas frescas en general difieren de las variedades de requesón con cuajo (por ej., Camembert, Cheddar, Emmenthal) donde la coagulación normalmente es inducida por la acción del cuajo a valores de pH 6,4-6,6, en que la coagulación normalmente tiene lugar cerca del punto isoeléctrico de la caseína, es decir, por ej., a pH 4,6 o a valores superiores cuando se usan temperaturas elevadas, por ej., en Ricotta a pH típicamente por encima de 6,0 y temperatura típicamente aproximadamente 80°C. En una realización preferida, el queso pertenece a la clase de requesón con cuajo.

Una composición láctea puede ser cualquier composición que comprenda constituyentes de la leche de vaca. Los constituyentes de la leche pueden ser cualquier constituyente de la leche tal como grasa de la leche, proteína de la leche, caseína, proteína de suero lácteo y lactosa. Una fracción de la leche puede ser cualquier fracción de la leche tal como *por ej.*, leche desnatada, leche agria, suero lácteo, nata, leche en polvo, leche entera en polvo, leche desnatada en polvo. En una realización preferida, la composición láctea comprende leche, leche desnatada, leche agria, leche entera, suero lácteo, nata o cualquier combinación de los mismos. En una realización más preferida, la composición láctea consta de leche, tal como leche desnatada, leche entera, nata o cualquier combinación de los mismos. En más realizaciones, la composición láctea se prepara, totalmente o en parte, de fracciones de leche seca, tales como *por ej.*, leche entera en polvo, leche desnatada en polvo, caseína, caseinato, proteína total de la leche o suero de mantequilla ácido en polvo o cualquier combinación de los mismos. Una composición láctea comprende leche de vaca y o una o más fracciones de la leche de vaca. Las fracciones de la leche de vaca pueden ser de cualquier raza de vaca (*Bos Taurus (Bos taurus taurus)*, *Bos indicus (Bos indicus taurus)*) y cruces de éstas. En una realización, la composición láctea comprende leche de vaca y/o fracciones de la leche de vaca que se originan de dos o más razas de vacas. La composición láctea también comprende leche de otros mamíferos que se usan para la preparación de queso, tal como leche procedente de cabra, búfalo o camello. La composición láctea para producción de queso puede estar estandarizada a la composición deseada por eliminación de todo o una porción de cualquiera de los componentes de la leche cruda y/o por adición a las mismas de cantidades adicionales de dichos componentes. Esto se puede hacer *por ej.*, por separación de leche en nata y leche en su llegada a producto lácteo. Así, la composición láctea se puede preparar como se ha hecho de manera convencional fraccionando la leche y recombinado las fracciones para que se obtenga la composición final deseada de la composición láctea. La separación se puede hacer en centrífugas continuas que conducen a una fracción de leche desnatada con un contenido en grasa muy bajo (es decir, <0,5%) y nata con por ej., >35% de grasa. La composición láctea se puede preparar mezclando nata y leche desnatada. En otra realización, el contenido en proteína y/o caseína se puede estandarizar por el uso de ultrafiltración. La composición láctea puede presentar cualquier contenido en grasa total que se encuentre adecuado para que se produzca el queso por el procedimiento de la invención.

Se puede añadir calcio a la composición láctea en cualquier etapa apropiada antes de y/o durante la elaboración del queso, tal como antes de, simultáneamente con, o después de adición de cultivo iniciador. En una realización preferida, se añade calcio tanto antes de, como después de, el tratamiento térmico. Se puede añadir calcio en cualquier forma adecuada. En una realización preferida, se añade calcio como sal de calcio, *por ej.*, como CaCl<sub>2</sub>. Se puede añadir cualquier cantidad adecuada de calcio a la composición láctea. La concentración del calcio añadido estará normalmente en el intervalo 0,1-5,0 mM, tal como entre 1 y 3 mM. Si se añade CaCl<sub>2</sub> a la composición láctea la cantidad estará normalmente en el intervalo 1-50 g por 100 litros de composición láctea, tal como en el intervalo 5-30 g por 1.000 litros de composición láctea, preferiblemente en el intervalo 10-20 g por 100 litros de composición láctea.

El recuento bacteriano de leche desnatada se puede disminuir por etapas convencionales. La composición láctea puede ser sometida a un procedimiento de homogeneización antes de la producción de queso, tal como en la producción de Queso Azul Danés.

La invención se ilustra por los ejemplos a continuación.

## Ejemplos

## Ejemplo 1

Clonación y expresión del gen de la sialidasa ZJW.

Se cultivó cepa *Penicillium chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (ATCC28089) durante 3 días a 30 grados Celsius en PDB (Caldo de dextrosa de patata (por sus siglas en inglés), Difco) y se aisló ADN cromosómico del micelio usando el estuche Q-Biogene (catálogo nº 6540-600; Omnilabo International BV, Breda, Países Bajos), usando las instrucciones del suministrador. Este ADN cromosómico se usó para la multiplicación de la secuencia codificadora del gen de la sialidasa usando PCR.

Para multiplicar específicamente el gen de la sialidasa ZJW del ADN cromosómico de la cepa de *Penicillium chrysogenum* Wisconsin 54-1.255 (ATCC28089), se diseñaron dos cebadores PCR. Las secuencias cebadoras se obtuvieron parcialmente de una secuencia que se encontró en el ADN genómico de *Penicillium chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (ATCC28089) y se representa en la SEC ID Nº 1. Se encontró que esta secuencia presenta homología con secuencias de la sialidasa de Actinomyces y Arthrobacter. Sin embargo, aún no se han descrito sialidasas fúngicas homólogas. Es por lo tanto sorprendente que pudiéramos encontrar un gen codificador de una sialidasa segregada de un hongo. Se describe en la presente memoria por primera vez la expresión y caracterización eficaz de una sialidasa fúngica segregada. La secuencia proteica de la proteína sialidasa completa, incluyendo pre- y pro-secuencias potenciales se representa en la SEC ID Nº 3. La ventaja de la enzima fúngica comparado con los homólogos bacterianos es que la enzima fúngica se puede sobreexpresar fácilmente y segregar en cantidades que sean importantes para aplicaciones en la industria alimentaria.

Zjw-dir 5'-CCCTTAATTAACATCATAGGCATCATGCTATCTTCATTGATGATTTT

Zjw-rev5'-TTAGGCGCGCCGTACATACATGTACACATAGACC

El primer cebador PCR directo (ZJW-dir) contiene 23 nucleótidos ZJW que codifican la secuencia que empieza en el codón de partida ATG, precedido por una secuencia de 23 nucleótidos incluyendo un sitio de restricción *PacI* (SEC ID Nº 4). El segundo cebador inverso, (ZJW-rev) contiene nucleótidos complementarios a la cadena inversa de la región aguas abajo de la secuencia codificadora de ZJW precedida por un sitio de restricción *AscI* (SEC ID Nº 5). Usando estos cebadores pudimos multiplicar un fragmento de 1,4 kb de tamaño con ADN cromosómico de cepa de *Penicillium chrysogenum* Wisconsin 54-1255 (ATCC28089) como plantilla. Se aisló el fragmento de 1,4 kb de tamaño así obtenido, se digirió con *PacI* y *AscI* y se purificó. El fragmento *PacI* / *AscI* que comprendía las secuencias codificadoras de ZJW se intercambió con el *phyA PacI* / *AscI* de pGBFIN-5 (patente internacional WO 99/32617). El plásmido resultante es el vector de expresión de ZJW denominado pGBFINZJW (véase la fig. 1). El vector de expresión pGBFINZJW se linearizó por digestión con *NotI*, que elimina todas las secuencias derivadas de *E. coli* del vector de expresión. El ADN digerido se purificó usando extracción con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (24:23:1) y precipitación con etanol. Estos vectores se usaron para transformar *Aspergillus niger* CBS513.88. Un procedimiento de transformación de *Aspergillus niger* se describe extensamente en la patente internacional WO 98/46772. También se describe cómo seleccionar transformantes en placas de agar que contienen acetamida y seleccionar integrantes multicopia fijados como objetivo. Preferiblemente, los transformantes de *A. niger* que contienen copias múltiples de la casete de expresión se seleccionan para la generación adicional de material de muestra. Para el vector 30 de expresión pGBFINZJW se purificaron transformantes de *A. niger*, primero poniendo en placas transformantes individuales en placas de medio selectivo seguido por puesta en placas de una sola colonia sobre placas de PDA (agar de patata y dextrosa: PDB + agar al 1,5%). Se recogieron las esporas de los transformantes individuales después de crecimiento durante 1 semana a 30 grados Celsius. Las esporas se almacenaron refrigeradas y se usaron para la inoculación del medio líquido.

Se usó una cepa de *A. niger* que contiene copias múltiples del casete de expresión para generación de material de muestra por cultivo de la cepa en cultivos en frascos de agitación. Un método útil para cultivo de cepas *A. niger* y separación del micelio del caldo de cultivo se describe en la patente internacional WO 98/46772. El medio de cultivo fue en CSM-MES (150 g de maltosa, 60 g de Soytone (Difco), 15 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O, 1 g de MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 1 g de L-arginina, 80 mg de Tween-80, 20 g de MES pH 6,2 por medio litro). Se tomaron muestras de 5 ml el día 4-8 de la fermentación, se centrifugaron durante 10 min a 500 rad/s (5.000 rpm) en un Hereaus labofuge RF y se almacenaron los sobrenadantes a -20°C hasta análisis adicionales.

Determinación de peso molecular SDS-Page (PM): se analizó una muestra por SDS-PAGE en el sistema de gradiente NuPAGE Novex Bis-Tris al 4-12 % usando tampón de migración NuPAGE MES-SDS (Invitrogen (Breda - Países Bajos)). Se redujeron las muestras antes de carga, usando agente de reducción NuPAGE según el protocolo del suministrador. Para estimar el peso molecular de la proteína producida, se usaron proteínas marcadoras (SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen)). Se recorren los geles y se marcan usando Simply Blue Protein Strain (Invitrogen) según las instrucciones del suministrador y se estimó el peso molecular de la proteína producida por comparación con las proteínas estándar. En el presente ejemplo se analizaron 13 microlitros del sobrenadante del caldo de fermentación del transformante.

Llegó a ser evidente que los transformantes que contiene el vector pGBFINZJW segregaba una proteína de peso molecular aparente de aproximadamente 50 kDa cuando se analizó con SDS-PAGE. Puesto que esto es ligeramente mayor que el peso molecular que se prevé de la secuencia proteica, se presume que después de eliminación de la secuencia señal tiene lugar algo de glucosilación cuando se segrega sialidasa ZJW de *Penicillium chrysogenum* de *Aspergillus niger*.

Las cepas seleccionadas se pueden usar para aislamiento y purificación de una cantidad mayor de sialidasa fúngica, cuando se extrapola la fermentación y el procedimiento aguas abajo. Esta enzima que se puede usar para análisis adicional y para el uso en diversas aplicaciones industriales.

#### Ejemplo 2

##### 10 Purificación y caracterización de la sialidasa.

Se produjo sialidasa por fermentación como se describe en el Ejemplo 1. Se midió la actividad enzimática usando el estuche de ensayo de neuraminidasa Amplex Red (obtenido de Invitrogen). Se diluyó el filtrado del cultivo (100 ml) con agua milliQ a una conductividad de 4,8 mS/cm y se concentró a 70 ml por ultrafiltración usando una membrana Biomax-10 (obtenida de Millipore). El pH se ajustó a 6,0 usando NaOH y se cargó la muestra sobre una columna de intercambio iónico HiTrapQ de 5 ml (obtenida de Amersham, 5 ml/min), equilibrada en citrato de sodio 20 mM (pH 6,0). El flujo por la columna, que contenía la sialidasa, se recogió y se dializó frente a Tris.HCl 25 mM (pH 7,0) y se cargó sobre una HiTrap Q FF de 5 ml (5 ml/min), equilibrada en el mismo tampón. La sialidasa estuvo presente en la fracción de circulación y se recogió. Se dializó después la disolución de enzima frente a citrato de sodio 30 mM (pH 4,0, tampón A) y se aplicó sobre una columna HiTrap SP de 5 ml (obtenida de Amersham, 5 ml/min), equilibrada en tampón A. Después de cargar la enzima, se lavó la columna con 3 volúmenes de columna de tampón A y se eluyó la enzima con un gradiente lineal de 20 volúmenes de columna de tampón A a tampón B (tampón B: citrato de sodio 30 mM, pH 4,0 que contenía NaCl 1 M). Se identificaron las fracciones que contenían sialidasa y se combinaron. Se determinó la concentración en proteína con el reactivo Bradford (obtenido de Sigma), usando albúmina de suero bovino como proteína de referencia. La proteína fue >95% pura como se juzgó por la ausencia de bandas de contaminación en electroforesis en gel de dodecilmopoliacrilamida sódica. La sialidasa migra a un peso molecular aparente de 47 kD, que es ligeramente mayor que el peso molecular de 42,7 kD, calculado en base a la secuencia de aminoácidos prevista. La preparación enzimática no muestra actividad proteolítica en una serie de sustratos ZAAXpNA (Z=grupo benzoilo, A=alanina, X=cualquier resto aminoácido, pNA=para-nitroanilida), indicando ausencia de actividad endo-proteasa.

##### 30 Ejemplo 3

Método de preparación de miniaturas de queso.

Se produjeron miniaturas de queso como se describe por Shakeel-Ur-Rehman *et al.* (Protocol for the manufacture of miniature cheeses in Lait, 78 (1.998), 607-620). Se usó leche de vaca homogeneizada entera pasteurizada pero también se puede usar leche de vaca cruda o leche de vaca reconstituida. La leche se transfirió a botes de centrífuga de plástico de boca ancha (200 ml por bote) y se enfrió a 31°C. Con posterioridad, se añadieron 1,8 Unidades de cultivo iniciador DS 5LT1 (DSM Gist B. V., Delft, Países Bajos) a cada uno de los 200 ml de leche pasteurizada en los botes de centrífuga y se maduró la leche durante 20 minutos. Después, se añadió CaCl<sub>2</sub> (132 µl de una disolución de 1 mol.l<sup>-1</sup> por 200 ml de leche madura). Finalmente se añadió el coagulante (0,04 IMCU por ml); cuando se usó sialidasa, esto se añadió junto con el coagulante. Las disoluciones de leche se mantuvieron durante 40-50 minutos a 31°C hasta que se formó un coágulo. Se cortó manualmente el coágulo mediante cortadores de hilo estirado, espaciados 1 cm aparte en un marco. Se dejó curar durante 2 minutos seguido por agitación suave durante 10 minutos. Después de eso, se aumentó gradualmente la temperatura a 39°C más de 30 minutos con agitación continua de la mezcla de cuajada / suero lácteo. Cuando se alcanza un pH de 6,2 las mezclas de cuajada / suero lácteo se centrifugaron a temperatura ambiente durante 60 minutos a 1.700 g. Se drenó el suero lácteo y se mantuvieron las cuajadas en un baño de agua a 36°C. Se invirtieron los quesos cada 15 minutos hasta que el pH hubo disminuido a 5,2-5,3 y después se centrifugaron a temperatura ambiente a 1.700 g durante 20 minutos. Después de la fabricación se pesaron los quesos.

#### Ejemplo 4

Método para determinar el cuajado del queso.

Se siguió el cuajado del queso usando el Optigraph (Alliance Instruments, Francia), como se describe por Kubarsep *et al.* (Acta Agric Scand Sección A (2.005) 55, 145-148). El tiempo de coagulación de una disolución de sustrato de leche estándar, después de adición de una disolución enzimática de coagulación de leche, se determinó según un procedimiento clásico (IDF157 A [2]). Se prepararon disoluciones de sustrato de leche añadiendo 11 gramos de leche en polvo desnatada con poco calor (Nilac, obtenido de NIZO, Países Bajos) a 100 ml agua milliQ que contenía CaCl<sub>2</sub> 4,5 mM. Se agitó la disolución de leche con un agitador magnético durante 30 minutos. Para sedimentar la leche, se apartó la disolución durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. El pH de la leche es

- 5 aproximadamente 6,5. Se diluyó la enzima de coagulación de la leche con agua milli-Q para conseguir un tiempo de coagulación de cuajo ( $r$ ) entre 8 y 15 minutos. Se transfirieron 10 ml de disolución de leche a las cubetas de las muestras del Optigraph. Se ajustó la leche a la temperatura de reacción de 32°C. Se pipetearon 200  $\mu$ l de la muestra enzimática diluida en un aparato de cuchara múltiple y se añadió de una vez a la leche. Esta manipulación es el punto de partida del ensayo de coagulación. Se mezclaron las enzimas y la leche con las cucharas, suministradas con el Optigraph para este fin. Se vigiló la coagulación durante 45 minutos.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> DSM IP Assets B.V.

<120> NUEVA SIALIDASA

<130> 26026WO

<160> 5

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 2542

<212> ADN

<213> Penicillium chrysogenum

<400> 1

agctgaagaa	tagatgaatt	tctatgttgc	gaataatagt	agtttccaat	actacaaatt	60
tggagagtca	taaagtacta	aaatgtttgg	atatcccac	ctagcgtggg	gattgggtca	120
gtgctatttg	accgatcgc	gtcgcgaaatg	caaccgatc	ggatcggagt	ccggtcttcg	180
cggctcgtatt	cagacatcta	gcgggggccat	caatagcgcg	tggtaacgca	tgacactgcg	240
tggcgtcgca	tgtctgattc	agtggttcgc	ttcagttctt	caacgttgcg	gtcaatgaga	300
ttgtggtaac	gcagtcagca	tacagatcct	gtgaagctaa	accagcagag	ccagtgggac	360
cagtgggacc	agtggatacc	ttcactccc	cagggtctgc	atthttccggg	gaaaccgacg	420
taagccaagg	aactcaaaat	tggatgttac	tatctatcct	ctaccgctca	atacactata	480
tgtgttattg	gatttccctc	tatcaaatcg	aatagactgc	atagattgca	gtcctttcct	540
ttcgtcagat	tatccagatt	atccagatca	gtcccgaag	tgaaactgaa	tccaatcttc	600
gatataaata	gctccttggt	cctccaaaaa	aacaagagtc	atcatctcag	ttagctgttt	660
ccacacttcc	tctttcactc	aaaagcccgc	tttttcaggt	caatthttagt	ggactaactt	720
cacgatgcta	tcttcattga	tgtatthggc	acgtgagtgc	tccatcttgc	gcgctatctc	780
cttatgtgcc	atcctcgcgc	tggcaactcc	tgccggcgagc	gcaagcgtca	cagcaaagca	840
cacgctggcc	acaaatggaa	aggggctggt	tccacagtac	cgaattggtg	ccttggcaag	900
tctgggaaat	ggtgttctcc	tggcctcata	tgatggcgcc	ccagatggag	gagattcgc	960
atccccaaat	tcaattctac	aacgacgcag	tacggacggt	gggaagactt	ggggcaacc	1020
aacatatatt	gcgcgaggtc	aaccagcgtc	gtcgcgactc	caacagtagc	gctthttagt	1080
ccaagctac	gtggtcgact	ccggtactgg	aaaggtcttt	aatthccatg	tcttctcgaa	1140
gaaccagggg	tttctcaata	gcaaaattgg	aaatgacgac	accgacttaa	acatagtcag	1200
cgctgaagtc	tccgtttcga	ctgatggagg	acttagctgg	accactgatc	cagaccatga	1260
atcctctttg	cctcccgttg	catctgccga	cgthgggtgca	ccgccactca	ttacgaaagc	1320
aatcaagccc	gtgggtagta	cttccaacgg	ggtagccaac	gtcgggtggaa	ttactgggat	1380
gtttgcctca	tccggagagg	ggattcaact	caaatacggc	aaacacgccg	ggcgcctgg	1440
tcaacaattc	cttgggaaag	tcatccaatc	agacggttca	aaggtctcgc	aagcctacag	1500
tgtctacagt	gacgacggtg	gcgctatatg	gaagatgggg	aaagtcattg	gcactgggat	1560
ggatgagaac	aaagttgtgg	agctatcaaa	cggcaacttg	atgcttaact	cagcccag	1620
cgatggtagc	ggatctgaa	aggtggcaac	ctcaaccgat	ggtgggtgaaa	cttgggtcaac	1680
accagcaagc	gaaacccaac	tccctgacct	aggaaataac	ggagcaatta	ccaggatgta	1740
tctgatgcg	gcacatggtt	cggccaatgc	caagatcctc	ctgthttacca	atgcaaacag	1800
taaaacaagc	cgaagcaatg	gtacaatccg	ctattcctgt	gacgacggaa	agacctggtc	1860
ttctggcgca	gtgttccagt	ctggctcgat	gtcctattcc	actgtcaccg	cactcggcga	1920
tgacaggttc	ggaatatttt	acgaggggga	tagcaacgac	ctcgtctaca	ttgaagtttc	1980
caaggatttt	attggggttt	cctgctgata	aaactcccat	tggcagtggtg	ctctacttgg	2040
gaacttgggt	tttacattgt	acctaggtct	atgtgtacat	gtatgtacta	cagcgtcatc	2100
tcaaatattc	ttttgggaaa	ggacctgaca	atggcggcag	catgatggat	tttgtggctc	2160
ggcatttat	tgacgatggc	acacgatagc	tatcgaactc	actggtagct	attgcaatg	2220
ttcagtagc	gtggcggttg	ttcctctagt	cacgcctgga	tgaaatcaga	ccgttatagt	2280
gacaccttcc	tatgacacta	tattctgtat	tgtgaacca	atatttccat	ggtagtagtt	2340
tcaggtgaca	gcaagggcaa	aaattcttat	tgctcaaaag	taacattgca	tgtagagatc	2400
ccatagtcaa	ggtggcggtt	gagagattta	taggtggtaa	aatcatgcta	tttttaggct	2460
taggaacaat	gctcgcgaaga	cgaacgaacg	atgtagtagg	ttggattaga	gcccagtaag	2520
aatggaattc	ctatcacaag	ca				2542

<210> 2

<211> 1224

<212> ADN

<213> *Penicillium chrysogenum*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1224)

<400> 2

```

atg cta tct tca ttg atg tat ttg gca cgt gag tgc tcc atc ttg cgc      48
Met Leu Ser Ser Leu Met Tyr Leu Ala Arg Glu Cys Ser Ile Leu Arg
1      5      10      15
gct atc tcc tta tgt gcc atc ctc gcc gtg gca act cct gcg gcg agc      96
Ala Ile Ser Leu Cys Ala Ile Leu Ala Val Ala Thr Pro Ala Ala Ser
20      25      30
gca agc gtc aca gca aag cac acg ctg gcc aca aat gga aag ggg ctg      144
Ala Ser Val Thr Ala Lys His Thr Leu Ala Thr Asn Gly Lys Gly Leu
35      40      45
ttt cca cag tac cga att gtt gcc ttg gca agt ctg gga aat ggt gtt      192
Phe Pro Gln Tyr Arg Ile Val Ala Leu Ala Ser Leu Gly Asn Gly Val
50      55      60
ctc ctg gcc tca tat gat ggg cgc cca gat gga gga gat tcg cca tcc      240
Leu Leu Ala Ser Tyr Asp Gly Arg Pro Asp Gly Gly Asp Ser Pro Ser
65      70      75      80
cca aat tca att cta caa cga cgc agt acg gac ggt ggg aag act tgg      288
Pro Asn Ser Ile Leu Gln Arg Arg Ser Thr Asp Gly Gly Lys Thr Trp
85      90      95
ggc aac cca aca tat att gcg cga ggt caa cca gcg tcg tcg aca ctc      336
Gly Asn Pro Thr Tyr Ile Ala Arg Gly Gln Pro Ala Ser Ser Thr Leu
100      105      110
caa cag tac ggc ttt agt gac cca agc tac gtg gtc gac tcc ggt act      384
Gln Gln Tyr Gly Phe Ser Asp Pro Ser Tyr Val Val Asp Ser Gly Thr
115      120      125
gga aag gtc ttt aat ttc cat gtc ttc tcg aag aac cag gga ttt ctc      432
Gly Lys Val Phe Asn Phe His Val Phe Ser Lys Asn Gln Gly Phe Leu
130      135      140
aat agc gaa att gga aat gac gac acc gac tta aac ata gtc agc gct      480
Asn Ser Glu Ile Gly Asn Asp Asp Thr Asp Leu Asn Ile Val Ser Ala
145      150      155      160
gaa gtc tcc gtt tcg act gat gga gga ctt agc tgg acc act gat cca      528
Glu Val Ser Val Ser Thr Asp Gly Gly Leu Ser Trp Thr Thr Asp Pro
165      170      175
gac cat gaa tcc tct ttg cct ccc gtt gca tct gcc gac gtt gcc aac      576
Asp His Glu Ser Ser Leu Pro Pro Val Ala Ser Ala Asp Val Ala Asn
180      185      190
gtc ggt gga att act ggg atg ttt gcc tca tcc gga gag ggg att caa      624
Val Gly Gly Ile Thr Gly Met Phe Ala Ser Ser Gly Glu Gly Ile Gln
195      200      205
ctc aaa tac ggc aaa cac gcc ggg cgc ctg gtt caa caa ttc ctt ggg      672
Leu Lys Tyr Gly Lys His Ala Gly Arg Leu Val Gln Gln Phe Leu Gly
210      215      220
aaa gtc atc caa tca gac ggt tca aag gtc tcg caa gcc tac agt gtc      720
Lys Val Ile Gln Ser Asp Gly Ser Lys Val Ser Gln Ala Tyr Ser Val
225      230      235      240
tac agt gac gac ggt ggc gct ata tgg aag atg ggg aaa gtc att ggc      768
Tyr Ser Asp Asp Gly Gly Ala Ile Trp Lys Met Gly Lys Val Ile Gly
245      250      255
act ggg atg gat gag aac aaa gtt gtg gag cta tca aac ggc aac ttg      816
Thr Gly Met Asp Glu Asn Lys Val Val Glu Leu Ser Asn Gly Asn Leu
260      265      270
atg ctt aac tca cgc ccg agc gat ggt agc gga tat cga aag gtg gca      864
Met Leu Asn Ser Arg Pro Ser Asp Gly Ser Gly Tyr Arg Lys Val Ala
275      280      285
acc tca acc gat ggt ggt gaa act tgg tca aca cca gca agc gaa acc      912
Thr Ser Thr Asp Gly Gly Glu Thr Trp Ser Thr Pro Ala Ser Glu Thr
290      295      300

```

caa ctc cct gac cca gga aat aac gga gca att acc agg atg tat cct 960  
 Gln Leu Pro Asp Pro Gly Asn Asn Gly Ala Ile Thr Arg Met Tyr Pro  
 305 310 315 320  
 gat gcg gca cat ggt tcg gcc aat gcc aag atc ctc ctg ttt acc aat 1008  
 Asp Ala Ala His Gly Ser Ala Asn Ala Lys Ile Leu Leu Phe Thr Asn  
 325 330 335  
 gca aac agt aaa aca agc cga agc aat ggt aca atc cgc tat tcc tgt 1056  
 Ala Asn Ser Lys Thr Ser Arg Ser Asn Gly Thr Ile Arg Tyr Ser Cys  
 340 345 350  
 gac gac gga aag acc tgg tct tct ggc gca gtg ttc cag tct ggc tcg 1104  
 Asp Asp Gly Lys Thr Trp Ser Ser Gly Ala Val Phe Gln Ser Gly Ser  
 355 360 365  
 atg tcc tat tcc act gtc acc gca ctc ggc gat gac agg ttc gga ata 1152  
 Met Ser Tyr Ser Thr Val Thr Ala Leu Gly Asp Asp Arg Phe Gly Ile  
 370 375 380  
 ttt tac gag ggg gat agc aac gac ctc gtc tac att gaa gtt tcc aag 1200  
 Phe Tyr Glu Gly Asp Ser Asn Asp Leu Val Tyr Ile Glu Val Ser Lys  
 385 390 395 400  
 gat ttt att ggg gtt tcc tgc tga 1224  
 Asp Phe Ile Gly Val Ser Cys  
 405

<210> 3

<211> 407

<212> PRT

<213> *Penicillium chrysogenum*

<400> 3

Met Leu Ser Ser Leu Met Tyr Leu Ala Arg Glu Cys Ser Ile Leu Arg  
 1 5 10 15  
 Ala Ile Ser Leu Cys Ala Ile Leu Ala Val Ala Thr Pro Ala Ala Ser  
 20 25 30  
 Ala Ser Val Thr Ala Lys His Thr Leu Ala Thr Asn Gly Lys Gly Leu  
 35 40 45  
 Phe Pro Gln Tyr Arg Ile Val Ala Leu Ala Ser Leu Gly Asn Gly Val  
 50 55 60  
 Leu Leu Ala Ser Tyr Asp Gly Arg Pro Asp Gly Gly Asp Ser Pro Ser  
 65 70 75 80  
 Pro Asn Ser Ile Leu Gln Arg Arg Ser Thr Asp Gly Gly Lys Thr Trp  
 85 90 95  
 Gly Asn Pro Thr Tyr Ile Ala Arg Gly Gln Pro Ala Ser Ser Thr Leu  
 100 105 110  
 Gln Gln Tyr Gly Phe Ser Asp Pro Ser Tyr Val Val Asp Ser Gly Thr  
 115 120 125  
 Gly Lys Val Phe Asn Phe His Val Phe Ser Lys Asn Gln Gly Phe Leu  
 130 135 140  
 Asn Ser Glu Ile Gly Asn Asp Asp Thr Asp Leu Asn Ile Val Ser Ala  
 145 150 155 160  
 Glu Val Ser Val Ser Thr Asp Gly Gly Leu Ser Trp Thr Thr Asp Pro  
 165 170 175  
 Asp His Glu Ser Ser Leu Pro Pro Val Ala Ser Ala Asp Val Ala Asn  
 180 185 190  
 Val Gly Gly Ile Thr Gly Met Phe Ala Ser Ser Gly Glu Gly Ile Gln  
 195 200 205  
 Leu Lys Tyr Gly Lys His Ala Gly Arg Leu Val Gln Gln Phe Leu Gly  
 210 215 220  
 Lys Val Ile Gln Ser Asp Gly Ser Lys Val Ser Gln Ala Tyr Ser Val  
 225 230 235 240  
 Tyr Ser Asp Asp Gly Gly Ala Ile Trp Lys Met Gly Lys Val Ile Gly  
 245 250 255  
 Thr Gly Met Asp Glu Asn Lys Val Val Glu Leu Ser Asn Gly Asn Leu  
 260 265 270  
 Met Leu Asn Ser Arg Pro Ser Asp Gly Ser Gly Tyr Arg Lys Val Ala



**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un polipéptido aislado que presenta actividad sialidasa y que presenta una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad de secuencias de aminoácidos con los aminoácidos 1 a 407 de la SEC ID N° 3 o que presenta una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad de secuencias de aminoácidos con los aminoácidos 34 a 407 de la SEC ID N° 3.
- 10 2. El polipéptido según la reivindicación 1, que presenta un PM (peso molecular) menor que 55 kDa (SDS-Page), más preferiblemente el polipéptido presenta un PM (peso molecular) menor que 52 kDa (SDS-Page) o el polipéptido presenta un PM (peso molecular) menor que 50 kDa (calculado en base a la secuencia de aminoácidos), más preferiblemente el polipéptido presenta un PM (peso molecular) menor que 45 kDa (calculado en base a la secuencia de aminoácidos).
3. El polipéptido según la reivindicación 1, que es una enzima extracelular.
- 15 4. El polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que presenta una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, incluso más preferiblemente al menos 97% de identidad con los aminoácidos 1 a 407 de la SEC ID N° 3 o con los aminoácidos 34 a 407 de la SEC ID N° 3.
5. El polipéptido según la reivindicación 1, que comprende la secuencia de los aminoácidos de la SEC ID N° 3.
6. El polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que se obtiene de un hongo, preferiblemente un *Penicillium*, más preferiblemente de *Penicillium chrysogenum*.
- 20 7. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. Una construcción de ácidos nucleicos que comprende el polinucleótido de la reivindicación 7, unida de manera operable a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un huésped de expresión adecuado.
9. Un vector de expresión recombinante que comprende la construcción de ácidos nucleicos según la reivindicación 8.
- 25 10. Una célula huésped recombinante que comprende el vector de expresión recombinante de la reivindicación 9 o la construcción de ácidos nucleicos de la reivindicación 8.
11. Un método para producir el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende cultivar una cepa / célula huésped recombinante según la reivindicación 10, para producir un sobrenadante y/o células que comprenden el polipéptido y recuperar el polipéptido.
- 30 12. Uso de un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en la preparación de alimento o alimentación.

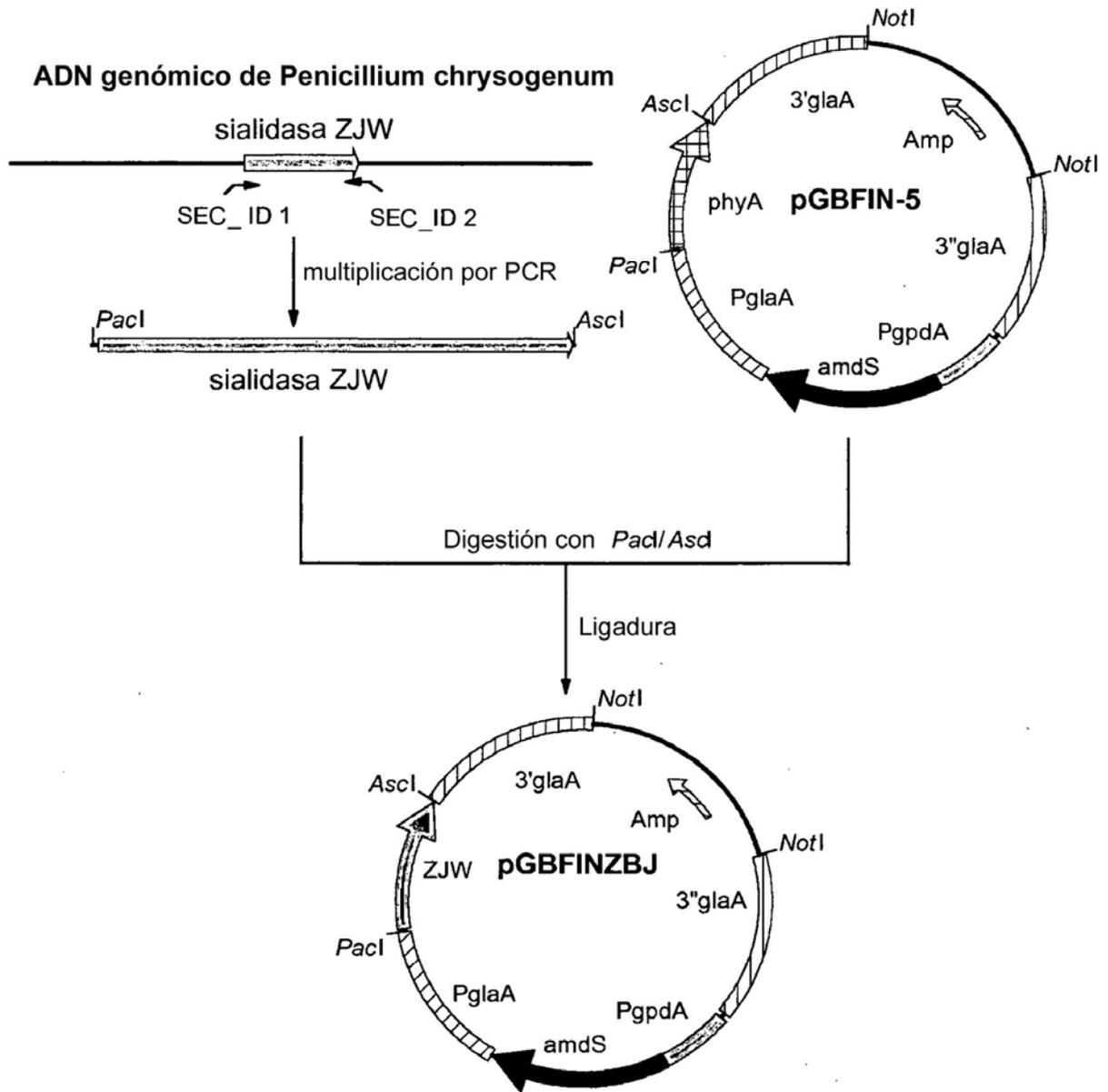


Figura 1