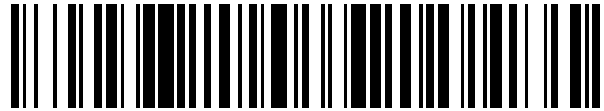


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 402**

51 Int. Cl.:

C12N 9/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.07.2014 PCT/EP2014/064913**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.01.2015 WO15007638**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2014 E 14738514 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 3022301**

54 Título: **Composición de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche**

30 Prioridad:

18.07.2013 EP 13177064

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

08.10.2018

73 Titular/es:

**CHR. HANSEN A/S (100.0%)
Boege Allé 10-12
2970 Hoersholm, DK**

72 Inventor/es:

**LUND, MARTIN;
JACOBSEN, JONAS y
VAN DEN BRINK, JOHANNES MAARTEN**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 685 402 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

Composición de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una composición de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche granulada líquida o seca y a un método para aislar la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche de interés.

10

Antecedentes de la técnica

La coagulación enzimática de la leche con enzimas coaguladoras de leche, tales como quimosina y pepsina, es uno de los procesos más importantes en la fabricación de quesos. La coagulación enzimática de leche es un proceso de dos fases: una primera fase en la que una enzima proteolítica, quimosina o pepsina, ataca la κ -caseína, dando como resultado un estado metaestable de la estructura micelar de la caseína y una segunda fase, en la que la leche posteriormente se coagula y forma un coágulo.

15

La quimosina (EC 3.4.23.4) y la pepsina (EC 3.4.23.1), las enzimas coaguladoras de leche del estómago de mamífero, son proteasas aspárticas que pertenecen a una amplia clase de peptidasas.

20

Los productos enzimáticos para la coagulación de leche, comerciales pertinentes a menudo son composiciones líquidas y en la técnica se describe numerosas formas diferentes para intentar estabilizar la enzima de coagulación de leche en el producto - por ejemplo para mejorar la estabilidad en el almacenamiento de la enzima.

25

Por ejemplo, el documento EP2333056A1 (DSM, fecha de presentación 12.04.2007) describe que formiato, acetato, lactato, propionato, malato, fumarato o propanodiol pueden aumentar la estabilidad de la enzima proteasa aspártica en una composición/producto líquidos.

30

El documento WO2012/127005A1 (DSM) describe una composición de quimosina líquida estable que comprende una sal inorgánica en una concentración de 2-100 g/kg y en conserva ante tal como formiato, acetato, lactato, propionato, malato, benzoato, sorbato o fumarato, glicol (etanodiol), propilenglicol (propanodiol), glicerol, eritritol, xilitol, manitol, sorbitol, inositol o galactitol.

35

El polietilenglicol (PEG) es un polímero de óxido de etileno - como alternativa se puede denominar polioxietileno (POE). PEG está disponible en el mercado con una amplia gama de pesos moleculares tales como de 300 g/mol a 10.000.000 g/mol.

40

El documento US5139943 (Genencor, publicado el 18 de agosto de 1992) describe el uso de PEG a la recuperación de quimosina producida por vía microbiana mediante un sistema denominado de dos fases líquida-líquida, en el que se añaden PEG y sal inorgánica al medio/cerveza de fermentación con el fin de formar un sistema de dos fases líquida-líquida (acuoso) y a continuación recuperar/aislar la quimosina de la fase de PEG. En los ejemplos de trabajo se describe que se usó aproximadamente un 4-5 % en p/vol de PEG 800 y aproximadamente un 10 % en p/vol de sal de sulfato sódico con el fin de ser capaz de obtener el sistema de dos fases líquida-líquida (acuoso).

45

El documento US7998705B2 (Fujifilm, publicado el 16 de agosto de 2011) describe el uso de PEG para aumentar la capacidad de unión dinámica de una solución con alto contenido de sal (por ejemplo, caldo de cultivo celular) en una resina de intercambio iónico y de ese modo ser capaz de purificar una proteína de interés. Como ejemplos de proteínas de interés se mencionan globulina bovina, albúmina de suero bovino y lisozima - una enzima para coagulación de leche (tal como por ejemplo quimosina) no se menciona de forma explícita. En los ejemplos de trabajo (por ejemplo véase el Ejemplo 1) se describe que la mejor recuperación de proteínas se obtuvo usando aproximadamente un 6 % en p/v de PEG (preferiblemente PEG4600) - por ejemplo usando solamente un 0,5 % de PEG no se produjo prácticamente ningún efecto positivo en la recuperación/aislamiento de proteína.

50

Como se sabe en la técnica - el término PEGilación se refiere al acto de acoplar por vía covalente una estructura de polietilenglicol (PEG) a otra molécula más grande, por ejemplo, una proteína terapéutica (que a continuación se denomina PEGilada). La PEGilación, mediante el aumento del peso molecular de una molécula, puede producir varias ventajas farmacológicas significativas con respecto a la forma sin modificar, tal como: aumento de la solubilidad del fármaco, reducción de la frecuencia de dosificación.

60

El documento US2011/0008846A1 (Qiagen) describe la PEGilación de enzimas usadas en la industria y la Renina (Quimosina) se menciona como un ejemplo de una enzima usada en la industria adecuada dentro de una larga lista de enzimas usadas en la industria adecuadas. El ejemplo de trabajo solo se refiere a PEGilación de una Polimerasa - es decir, no hay ejemplo de trabajo con respecto a PEGilación de Renina (Quimosina).

65

En el presente documento puede ser pertinente observar que ninguna de las referencias de la técnica anterior que

se han citado anteriormente describe que PEG puede aumentar la estabilidad de las enzimas proteasa aspártica para coagulación de leche tal como por ejemplo quimosinas.

5 El documento DE1492060A1 (Nordmark-Werke GmbH, publicado en 1969) desvela un método para preparar una composición de pepsina mediante la adición de PEG con un peso molecular de 400-6000 a una concentración de un 1-20 % en peso (corresponde de 10000 a 200000 ppm).

Sumario de la invención

10 Un problema a resolver por la presente invención es proporcionar una nueva composición de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche (por ejemplo, quimosina), en la que la proteasa aspártica presenta un aumento de la estabilidad y/o actividad.

15 Otro problema a resolver por la presente invención es proporcionar un nuevo método para aislar una proteasa aspártica (por ejemplo, quimosina), en la que el método puede dar un aumento de la actividad de la composición de proteasa aspártica aislada.

20 La solución se basa en que los presentes inventores han identificado que mediante la adición de PEG o un polioxietileno sustituido similar (por ejemplo, Brij 35) a la quimosina se mejora de forma significativa la estabilidad física de la quimosina.

Las estructuras de PEG y Brij 35 se muestran en la Figura 1 en el presente documento.

25 Como se discute en los Ejemplos de trabajo en el presente documento - quimosina bovina (CHY-MAX®, Chr. Hansen A/S) y quimosina de camello (CHY-MAX® M, Chr. Hansen A/S) producidas por vía recombinante se purificaron por cromatografía, en los que PEG 800 y Brij 35 se añadieron antes de la elución desde la columna o PEG 800 y Brij 35 se añadieron al tampón de elución.

30 Las muestras que contenían PEG 800 o Brij 35 presentaban un aumento de 1,5 a dos veces de la actividad específica con respecto a la muestra de control purificada sin adición de PEG/Brij 35 (véase la discusión en el Ejemplo de trabajo 2 en el presente documento y en la Figura 2 en el presente documento).

35 El efecto del aumento de la actividad específica de las enzimas quimosinas significativa fue sorprendente para los presentes inventores, entre otras razones, porque se pudo observar inmediatamente después del aislamiento de la proteína.

40 Este aumento inmediato de la actividad específica observado no se puede explicar por el hecho de que PEG/Brij 35 solo por ejemplo aumentan la estabilidad de las enzimas durante el almacenamiento a más largo plazo disminuyendo los posibles problemas de precipitación durante el almacenamiento a más largo plazo, ya que no hay precipitación significativa de las enzimas inmediatamente después del aislamiento de la proteína de acuerdo con el protocolo/método de purificación usado en los Ejemplos de trabajo en el presente documento - es decir, también en el experimento de control sin adición de PEG/Brij 35 no hay precipitación significativa de las enzimas inmediatamente después del aislamiento de la proteína.

45 Sin queda limitado a la teoría - se cree que PEG/Brij 35 proporcionan un aumento de la estabilidad conformacional para las quimosinas y esto podría explicar el aumento de la actividad específica observado inmediatamente en los Ejemplos de trabajo en el presente documento.

50 Sin quedar limitado a la teoría - se cree que en la técnica anterior no se ha descrito ni sugerido que PEG o polímeros estructuralmente puedan aumentar la estabilidad de enzimas proteasa aspártica para coagulación de leche tales como por ejemplo quimosinas - en particular no se ha descrito que la estabilidad conformacional se pueda aumentar.

La estabilidad conformacional de una enzima se ilustra en la Figura 3 en el presente documento.

55 Como se sabe en la técnica - la pérdida de conformación es igual a la pérdida de actividad de la enzima.

En los Ejemplos de trabajo en el presente documento - también se demostró que la adición de PEG aumentaba la estabilidad durante el almacenamiento a más largo plazo de una composición de quimosina líquida y/o granulada.

60 Sin quedar limitado a la teoría - puede suceder que para las enzimas proteasas aspárticas para coagulación de leche (tales como por ejemplo quimosinas) la pérdida de la conformación estructural podría dar como resultado un aumento de la precipitación de las enzimas durante por ejemplo el almacenamiento más largo plazo por ejemplo en una formulación líquida.

Por consiguiente - puede suceder que PEG ayude a disminuir la precipitación de las enzimas para coagulación de leche durante el almacenamiento por ejemplo debido a que proporciona estabilidad conformacional a las enzimas.

65 Polietilenglicol (PEG) es un polímero de óxido de etileno y como alternativa se puede denominar polioxietileno

(POE) - un nombre IUPAC basado en la estructura para PEG es poli(oxietileno).

5 Tal como lo entiende la persona experta en el presente contexto - Brij 35 se puede denominar polioxietileno sustituido, en el que el sustituyente se puede visualizar como la estructura "C12" tal como se muestra en la Figura 1 en el presente documento.

10 Tal como lo entiende la persona experta en el presente contexto - los polímeros tales como por ejemplo Polivinilpirrolidona, Alcohol polivinílico, Acetato de polivinilo, Poliacrilonitrilo, Poliacrilato o Polimetacrilato se pueden considerar estructural funcionalmente relacionados con PEG/Brij 35.

10 Como se sabe en la técnica - los polímeros pueden ser un heteropolímero o copolímero, que es un polímero obtenido a partir de dos (o más) especies monoméricas, a diferencia de un homopolímero en el que solo se usa un monómero.

15 Tal como lo entiende la persona experta en el presente contexto - un copolímero que se obtiene a partir de dos (o más) especies monoméricas de las siguientes, óxido de etileno, vinilpirrolidona, alcohol vinílico, acetato de vinilo, acrilonitrilo, acrilato o metacrilato en el presente contexto se puede considerar estructural y funcionalmente relacionado.

20 Sin quedar limitado a la teoría - se cree que no hay razón técnica significativa para creer que los polímeros de ese tipo estructural y funcionalmente relacionados con PEG/Brij 35 no pudieran producir mejoras de estabilidad de proteasa aspártica para coagulación de leche pertinentes en el presente documento.

25 En los Ejemplos de trabajo pertinentes en el presente documento se usaron PEG 800 y Brij 35, que respectivamente tienen una masa molecular media de 8000 g/mol y 1225 g/mol.

En el presente contexto se cree que podría ser adecuado un polímero pertinente en el presente documento con una masa molecular (como alternativa denominará peso molecular (PM)) de 200 g/mol a 50.000 g/mol.

30 En el presente contexto se cree que podría ser adecuado un polímero pertinente en el presente documento con un número de monómeros/elementos de repetición (también denominado número "n") de $n = 5$ a $n = 1250$.

Como un ejemplo en la Figura 1 se puede observar que Brij 35 tiene $n = 23$.

Como se sabe en la técnica - PEG con $n = 1250$ tiene un PM de aproximadamente 50.000 g/mol y PEG 800 tiene un PM de aproximadamente 8.000 g/mol y $n = 200$.

35 En la Figura 6 se muestra un ejemplo de otro polímero de polisorbato 20 pertinente en el presente documento, que comprende una suma de 20 monómeros de óxido de etileno.

40 En el Ejemplo de trabajo 4 en el presente documento se demuestra que la adición de polisorbato 20 aumentaba la estabilidad de las composiciones de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche líquidas sometidas a ensayo.

45 Tal como lo entiende la persona experta en el presente contexto - el polisorbato 20 es un polímero con un número de monómeros/elementos de repetición (también denominado número "n") de 20 en relación a la característica (c) del primer aspecto en el presente documento.

Por ejemplo, usando la nomenclatura de la Figura 6 - el polisorbato 20 puede tener por ejemplo w, x, y, y z = 5 - es decir, 4 grupos de monómeros cada uno con $n = 5$.

50 Por consiguiente, cómo podría entender la persona con experiencia en el presente contexto - tal polímero de polisorbato 20 será en el presente contexto un polímero con $n = 5 \times 4 = 20$ en relación a la característica (c) del primer aspecto en el presente documento.

55 Tal como lo entiende la persona experta en el presente contexto - lo que es pertinente en el presente contexto es el número de monómeros pertinentes en el presente documento pertinente (por ejemplo, óxido de etileno) presentes en el polímero como tal.

Por ejemplo, el número total de monómeros pertinentes en el presente documento (por ejemplo, óxido de etileno) presentes en el polímero como tal es importante por ejemplo para la masa molecular del polímero pertinente en el presente documento.

60 Por consiguiente, como lo entiende la persona con experiencia en el presente contexto - la expresión "monómero de repetición" en relación con la característica (c) del primer aspecto en el presente documento se refiere al número total de monómeros pertinentes en el presente documento (por ejemplo, óxido de etileno) presentes en el polímero como tal.

65 Como se sabe en la técnica - las enzimas proteasas aspárticas para coagulación de leche se pueden visualizar como similares de forma relativamente estructural.

Como se sabe en la técnica - las secuencias de polipéptidos de proteasa aspártica para coagulación de la leche de tipo silvestre naturales diferentes de diferentes especies de mamífero o fúngicas (tales como por ejemplo bovinos, camellos, ovejas, cerdos, o mucor) tienen una similitud de la estructura terciaria relativamente elevada.

5 En la Figura 4 en el presente documento se proporciona un alineamiento de secuencias de quimosina a la coagulación de leche diferentes pertinentes en el presente documento de diferentes especies de mamíferos (vaca, búfalo, cabra, oveja, camello y cerdo) - como se puede observar en la figura 4 tienen una relación de las secuencias cercana y se sabe que tienen una similitud de la estructura terciaria muy elevada.

10 En la Figura 5 en el presente documento se proporciona un alineamiento de secuencias de enzimas proteasas aspárticas para coagulación de leche disponibles en el mercado pertinentes en el presente documento diferentes de diferentes especies de mamíferos o fúngicas (quimosina de camello, quimosina de vaca, pepsina de vaca, pepsina de mucor fúngico y pepsina de Endothia fúngica).

15 Se puede decir que las 5 secuencias diferentes de la figura 5 no son idénticas en gran medida - como sabe la persona con experiencia se sabe que estas 5 enzimas proteasas aspárticas para coagulación de leche diferentes tienen una similitud de la estructura terciaria elevada.

20 Como se ha discutido anteriormente y como se muestra en los Ejemplos de trabajo en el presente documento - la mejora/aumento de la estabilidad pertinente en el presente documento se ha demostrado para la quimosina bovina y para la quimosina de camello.

25 Sin quedar limitado a la teoría - se cree que no hay razón técnica significativa para creer que la mejora/aumento de estabilidad pertinente en el presente documento pertinente no debería ser pertinente para enzimas proteasas aspárticas para coagulación de leche en general - como se ha discutido anteriormente, se sabe que tienen una similitud de la estructura terciaria elevada y como entiende la persona con experiencia en el presente contexto esta similitud de la estructura terciaria hace plausible que la interacción polímero-enzima que se describe en el presente documento obtenga una mejora de la estabilidad que pudiera ser un efecto de clase general de las enzimas proteasas aspárticas para coagulación de leche pertinentes en el presente documento estructurales similares.

30 Por consiguiente, un primer aspecto de la invención se refiere a una composición de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche líquida que comprende:

- 35 (i): enzima proteasa aspártica para coagulación de leche con una fuerza de 25 IMCU/g de la composición a 30000 IMCU/g de la composición;
 (ii): polímero en una concentración de 1 ppm a 5000 ppm (p/p), y
 (iii) una sal en una concentración de 1 a 350 g/kg;

40 y en la que el pH de la composición es de 2 a 8;

y en la que el polímero es un polímero que tiene las siguientes características (a), (b) y (c):

45 (a): el polímero es un polímero de al menos un monómero seleccionado entre el grupo de monómeros que consiste en: óxido de etileno, vinilpirrolidona, alcohol vinílico, acetato de vinilo, acrilonitrilo, acrilato y metacrilato; y

(b): el polímero es un polímero con una masa molecular de 200 g/mol a 50.000 g/mol; y

(c): el polímero es un polímero con un número de monómeros/elementos de repetición (también denominado número "n") de $n = 5$ a $n = 1250$; y

50 (D): opcionalmente el polímero que tiene las características (a), (b) y (c) mencionadas anteriormente puede ser un polímero sustituido que comprende uno o más compuesto(s) sustituyente(s) de los monómeros de la característica (a) y si el polímero es un polímero sustituido la masa molecular del polímero sustituido como tal está dentro del intervalo de la característica (b) y la masa molecular del compuesto(s) sustituyente(s) es menor que la masa molecular de la parte polimérica del polímero sustituido.

55 Tal como lo entiende la persona experta en el presente contexto - la expresión "IMCU/g de la composición" en el apartado (i) del primer y/o aspecto se refiere a actividad enzimática de IMCU por gramo de la composición como tal.

Lo mismo sucede para el término "g/kg" en relación con el apartado (iii) del primer aspecto - es decir, se refiere a gramo de sal por kg de la composición como tal.

60 Puede ser preferido que la composición líquida del primer aspecto tenga un peso total de 10 g a 10000 kg. Como sabe la persona con experiencia en el presente contexto - una composición líquida pertinente en el presente documento del primer aspecto que tienen un peso de 1 kg tendrá aproximadamente un volumen de 1 litro.

65 Como se ha discutido anteriormente - Brij 35 se puede denominar polioxi-etileno sustituido, en el que el sustituyente Se puede visualizar como la estructura "C12" como se muestra en la Figura 1 en el presente documento y Brij 35,

tiene una masa molecular media de aproximadamente 1225 g/mol.

Por consiguiente, Brij 35 se puede visualizar como un ejemplo de un polímero sustituido de la característica opcional (D) del primer aspecto, en el que el compuesto sustituyente es la estructura "C12" como se muestra en la Figura 1 en el presente documento y la masa molecular del polímero sustituido como tal es 1225 g/mol y la masa molecular del compuesto sustituyente (estructura "C12") es significativamente menor que la masa molecular de la parte polimérica (polímero de óxido de etileno con $n = 23$).

Tal como lo entiende la persona experta en el presente contexto - la parte polimérica es la que tiene las características (a), (b) y (c) que se consideran de mayor importancia y los posibles compuesto(s) sustituyente(s) de opcionalmente la característica (D) se pueden visualizar como de menos importancia.

Como se ha discutido anteriormente - en la Figura 6 se muestra un ejemplo de otro polímero polisorbato 20 pertinente en el presente documento, que comprende una suma de 20 monómeros de óxido de etileno.

Como Brij 35 es polisorbato 20 (como alternativa denominado Tween 20) se entiende que es un polímero sustituido en el presente contexto. En el polisorbato 20 se encuentran los compuestos/grupo sustituyentes, los grupos sorbitán y laurato y las masas moleculares de los compuestos/grupos sustituyentes son significativamente menores que la masa molecular de la parte polimérica (es decir, los 20 monómeros de óxido de etileno).

Tal como lo entiende la persona experta en el presente contexto - el término genérico "polímero" abarca la expresión más específica "polímero sustituido" en el sentido de que un polímero puede estar sustituido o sin sustituir.

Como se ha discutido anteriormente - en el documento US51 39943 se usó aproximadamente un 4-5 % en p/vol de PEG 800 con el fin de poder obtener sistema de dos fases líquida-líquida (acuoso) y en el documento US7998705B2 se usó aproximadamente un 6 % p/v de PEG con el fin de obtener un aumento significativo de la capacidad de unión dinámica sobre una resina para cromatografía de intercambio iónico.

En la composición del primer aspecto solo se usan de 1 ppm a 5000 ppm en p/p (es decir, de un 0,0001 % a un 0,5 % en p/p) del polímero que se describe en el presente documento (por ejemplo, PEG) - es decir, una cantidad que es significativamente menor de la requerida en las referencias de la técnica anterior que se han discutido previamente.

Por consiguiente y sin quedar limitado a la teoría - se puede decir que es necesario usar cantidades significativamente menores de los polímeros pertinentes en el presente documento (por ejemplo, PEG) con el fin de obtener el aumento del efecto de estabilidad conformacional que se describe en el presente documento con respecto a la enzima para coagulación de leche en comparación con las cantidades usadas en la técnica anterior que se ha descrito previamente.

En el presente documento los polímeros pertinentes (por ejemplo, PEG) se pueden describir como adyuvantes de procesamiento.

El primer aspecto en el presente documento se refiere a una composición líquida - sin embargo, las enzimas proteasas aspárticas para coagulación de leche (por ejemplo, quimosina) también se deben comercializar como composición/producto granulado seco.

Por consiguiente, un segundo aspecto de la invención se refiere a una composición de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche granulada seca que comprende:

(i): enzima proteasa aspártica para coagulación de leche con una fuerza de 25 IMCU/g de la composición a 30000 IMCU/g de la composición;

(ii): polímero en una concentración de 1 ppm a 5000 ppm (p/p), y

(iii) una sal;

y en el que el pH de la composición suspendida en agua es de 2 a 8;

y en el que el polímero es un polímero que tiene las características (a), (b) y (c) y opcionalmente (D) del primer aspecto.

Como se ha discutido anteriormente - PEGilación se refiere al acto de acoplar por vía covalente una estructura de polietilenglicol (PEG) a otra molécula más grande, por ejemplo, una proteína terapéutica (que a continuación se denomina PEGilada).

Tal como lo entiende la persona experta en el presente contexto - la esencia de la presente invención no se refiere como tal a la PEGilación.

Por consiguiente y tal como lo entiende la persona con experiencia en el presente contexto - la composición de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche líquida y/o seca como se describe en el presente documento no es preferiblemente una composición, en la que el polímero se acopla por vía covalente a la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche.

Como se discute en el presente documento - una ventaja de la composición de enzima proteasa aspártica para

coagulación de leche como se describe en el presente documento es que es más estable durante su almacenamiento.

5 Por consiguiente, un tercer aspecto de la invención se refiere a un método para almacenamiento de una enzima proteasa aspártica para coagulación de leche, en el que el método comprende las siguientes etapas:

(a): proporcionar una composición de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche del primer o el segundo aspecto o cualquier realización pertinente del mismo en el presente documento; y

10 (b): almacenar la composición durante un periodo de tiempo de 90 días a 2000 días a una temperatura de -10 °C a 50 °C.

15 Una composición de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche como se describe en el presente documento se puede usar de acuerdo con la técnica - por ejemplo para fabricar un alimento o producto alimentario de interés (tal como por ejemplo un producto a base de leche de interés que podría ser por ejemplo un producto de queso).

20 Por consiguiente, un cuarto aspecto de la invención se refiere a un método para la fabricación de un alimento o producto alimentario que comprende la adición de una cantidad eficaz de a composición de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche de cualquiera del primer o el segundo aspecto o cualquier realización pertinente del mismo en el presente documento al alimento o ingrediente(s) alimentario(s) y llevar a cabo etapas de fabricación adicionales para obtener el alimento o producto alimentario.

25 Como se ha discutido anteriormente - mediante el uso de un polímero pertinente en el presente documento como se describe en el presente documento es posible aislar/purificar una muestra de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche con un aumento de la actividad específica.

30 Por consiguiente, un quinto aspecto de la invención se refiere a un proceso para aislar una enzima proteasa aspártica para coagulación de leche de interés a partir de un medio acuoso que comprende tan enzima de interés, en el que el método comprende las etapas de:

(i): obtener una muestra acuosa que consiste en un número de componentes incluyendo la proteasa aspártica;

(ii): añadir polímero en una concentración de 1 ppm a 5000 ppm a la muestra acuosa de la etapa (i) para obtener una muestra que contiene polímero; y

35 (iii): aislar la proteasa aspártica de la muestra que contiene polímero de la etapa (ii) y de ese modo obtener la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche aislada de interés;

en el que el polímero es un polímero que tiene las características (a), (b) y (c) y opcionalmente (D) del primer aspecto.

40 Como se ha discutido anteriormente - en el documento US51 39943 se usó aproximadamente un 4-5 % en p/vol de PEG 800 con el fin de poder obtener el sistema de dos fases líquida-líquida (acuoso) y en el documento US7998705B2 se usó aproximadamente un 6 % en p/v de PEG con el fin de obtener un aumento significativo de la capacidad de unión dinámica sobre una resina para cromatografía de intercambio iónico.

45 En el proceso del quinto aspecto solo se usa de 1 ppm a 5000 ppm en p/p (es decir, de un 0,0001 % a un 0,5 %) del polímero que se describe en el presente documento (por ejemplo, PEG) - es decir una cantidad que es significativamente menor que la requerida en las referencias de la técnica anterior que se han discutido anteriormente.

50 DEFINICIONES

Todas las definiciones de términos pertinentes en el presente documento están de acuerdo con lo que debería entender la persona con experiencia en relación al contexto técnico pertinente en el presente documento.

55 La expresión "enzima para coagulación de leche" se refiere a una enzima con actividad enzimática de coagulación de leche - es decir, una enzima para coagulación de leche activa. La actividad para coagulación de leche (C) se puede expresar en Unidades Internacionales de Coagulación de Leche (IMCU) por ml o IMCU por g. La persona con experiencia sabe cómo determinar la actividad enzimática para coagulación de la leche pertinente en el presente documento. En el Ejemplo de trabajo 1 en el presente documento se proporciona un ejemplo de un método convencional para determinar la actividad enzimática para coagulación de leche y actividad para coagulación de leche específica. Como se sabe en la técnica - la actividad de coagulación específica (IMCU/mg de proteína total) se determina dividiendo la actividad de coagulación (IMCU/ml) entre el contenido de proteína total (mg de proteína total por ml).

65 El término "ppm" se refiere a partes por millón. Como se sabe en la técnica - la unidad "ppm" se puede usar para una fracción de masa y el término ppm se usa en el presente documento en relación a la fracción de masa (p/p). Por

ejemplo, un polímero pertinente en el presente documento en una concentración por ejemplo de 500 ppm (p/p) en relación a por ejemplo una composición de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche pertinente en el presente documento se refiere a que el polímero está presente a 500 veces 1-millonésima de un gramo por gramo de composición de muestra, que corresponde a un 0,05 % en p/p. Dicho en otras palabras - 1 ppm (p/p) corresponde a un 0,0001 % (p/p) y 10000 ppm (p/p) corresponde a un 1 % (p/p).

El término "Identidad de Secuencia" se refiere a la relación entre dos secuencias de aminoácidos.

Para fines de la presente invención, el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se determina de acuerdo con la técnica y se determina preferiblemente usando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) tal como se pone en marcha del programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al.*, 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferiblemente la versión 3.0.0 o posteriores. Los parámetros opcionales usados son la penalización por apertura de espacio vacío de 10, penalización por extensión de espacio vacío de 0,5, y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión EMBOSS de BLOSUM62). La salida de la "identidad más larga" marcada como Needle (obtenida usando la opción -nobrief) se usa como el porcentaje de identidad y se calcula como sigue a continuación:

$(\text{Restos Idénticos} \times 100) / (\text{Longitud del Alineamiento} - \text{Número Total de Espacios Vacíos en el Alineamiento})$.

El término "variable" se refiere a un péptido que tiene actividad enzimática para coagulación de leche que comprende una alteración, es decir, una sustitución, inserción, y/o delección, en una o más (varias) posiciones. Una sustitución se refiere a una sustitución de un aminoácido que ocupa una posición con un aminoácido diferente; una delección se refiere a la eliminación de un aminoácido que ocupa una posición; y una inserción se refiere a la adición de 1-3 aminoácidos adyacentes a un aminoácido que ocupa una posición.

Los aminoácidos pueden ser naturales o no naturales - por ejemplo, la sustitución por ejemplo con un isómero D (o formas D) por ejemplo de D-alanina podría ser teóricamente posible.

A continuación se describe la realización de la presente invención, solo a modo de ejemplos.

Figuras

Figura 1: Estructuras de PEG y Brij 35

Figura 2: Muestra los resultados de la adición de un 0,1 % de PEG 800 o Brij 35 al tampón de elución en comparación con experimentos de control sin adición de PEG 800 o Brij 35. Véase por ejemplo el Ejemplo de trabajo 2 en el presente documento para detalles adicionales. En la figura 2A se muestran datos para quimosina de camello y en la figura 2B se muestran datos para quimosina bovina.

Figura 3: Se ilustra la estabilidad conformacional de una enzima.

Figura 4: Un alineamiento de secuencias de quimosina para coagulación de leche, diferentes pertinentes en el presente documento de diferentes especies de mamíferos (vaca, búfalo, cabra, oveja, camello y cerdo). Todas las secuencias de la figura 4 están disponibles para el público.

Figura 5: Un alineamiento de secuencias de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche diferentes disponibles en el mercado pertinentes en el presente documento de diferentes especies de mamíferos o fúngicas (quimosina de camello, quimosina de vaca, pepsina de vaca, pepsina de mucor fúngica y pepsina de Endothia fúngica). Todas las secuencias de la figura 5 están disponibles para el público.

Figura 6: Estructura de otro polímero polisorbato 20 pertinente en el presente documento, que comprende una suma de 20 monómeros de óxido de etileno.

Descripción detallada de la invención

Enzima proteasa aspártica para coagulación de leche

La discusión de realizaciones/ejemplos específicos de enzimas proteasas aspárticas para coagulación de leche pertinentes en el presente documento que sigue a continuación es pertinente para todos los aspectos de la invención tal como se discute en el presente documento.

En una realización preferida, la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche es una enzima para coagulación de leche seleccionada entre el grupo que consiste en quimosina (EC 3.4.23.4), pepsina (EC 3.4.23.1) y pepsina de mucor (EC 3.4.23.23).

Una enzima proteasa aspártica para coagulación de leche preferida es quimosina de *Camelius dromedarius* tal como se describe por ejemplo en el documento WO02/36752A2 (Chr. Hansen). Como alternativa en el presente documento como alternativa se puede denominar quimosina de camello y la secuencia de aminoácidos del

polipéptido maduro conocida públicamente es la que se muestra en la Figura 5 en el presente documento.

Como se sabe en la técnica - para la persona con experiencia es trabajo de rutina realizar variantes (es decir, modificaciones de aminoácido) de una enzima de interés sin cambiar de forma significativa las características de la enzima.

5 Por consiguiente, en una realización preferida, la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche es quimosina de *Camelius dromedarius* que comprende la secuencia de aminoácidos del polipéptido que se muestra en la Figura 5 en el presente documento (denominada "Quimosina_camello") o una variante de quimosina de *Camelius dromedarius*, en la que la variante comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90 % (preferiblemente al menos un 95 %, más preferiblemente al menos un 99 %) con la secuencia de aminoácidos del polipéptido de quimosina de camello que se muestra en la Figura 5 en el presente documento.

15 Una enzima proteasa aspártica para coagulación de leche preferida es la quimosina bovina. Como alternativa en el presente documento se puede denominar quimosina bovina y la secuencia de aminoácidos del polipéptido madura conocida públicamente es la que se muestra en la Figura 5 en el presente documento.

20 Por consiguiente, en una realización preferida, la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche es quimosina bovina que comprende la secuencia de aminoácidos del polipéptido que se muestra en la Figura 5 en el presente documento (denominada "Quimosina_bovina") o una variante de quimosina bovina, en la que la variante comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90 % (preferiblemente al menos un 95 %, más preferiblemente al menos un 99 %) con la secuencia de aminoácidos del polipéptido de quimosina bovina que se muestra en la Figura 5 en el presente documento.

25 Una enzima proteasa aspártica para coagulación de leche preferida es la pepsina bovina. Como alternativa en el presente documento se puede denominar pepsina bovina y la madura secuencia de aminoácidos del polipéptido conocida públicamente es la que se muestra en la Figura 5 en el presente documento.

30 Por consiguiente, en una realización preferida, la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche es pepsina bovina que comprende la secuencia de aminoácidos del polipéptido que se muestra en la Figura 5 en el presente documento (denominada "Pepsina_bovina") o una variante de pepsina bovina, en la que la variante comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90 % (preferiblemente al menos un 95 %, más preferiblemente al menos un 99 %) con la secuencia de aminoácidos del polipéptido de pepsina bovina que se muestra en la Figura 5 en el presente documento.

35 Una enzima proteasa aspártica para coagulación de leche preferida es la pepsina de Mucor (véase por ejemplo el documento EP0805866B1 (Harboe *et al*, Chr. Hansen A/S, Dinamarca)). La secuencia de aminoácidos del polipéptido madura conocida públicamente es la que se muestra en la Figura 5 en el presente documento.

40 Por consiguiente, en una realización precedente, la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche es pepsina la de Mucor que comprende la secuencia de aminoácidos del polipéptido que se muestra en la Figura 5 en el presente documento (denominada "Mucor") o una variante de pepsina de Mucor, en la que la variante comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90 % (preferiblemente al menos un 95 %, más preferiblemente al menos un 99 %) con la pepsina de Mucor secuencia de aminoácidos del polipéptido que se muestra en la Figura 5 en el presente documento.

45 Una enzima proteasa aspártica para coagulación de leche preferida es la pepsina de Endothia. La secuencia de aminoácidos del polipéptido madura conocida públicamente es la que se muestra en la Figura 5 en el presente documento.

50 Por consiguiente, en una realización preferida, la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche es la pepsina de Mucor que comprende la secuencia de aminoácidos del polipéptido que se muestra en la Figura 5 en el presente documento (denominada "Endothia") o una variante de pepsina de Endothia, en la que la variante comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90 % (preferiblemente al menos un 95 %, más preferiblemente al menos un 99 %) con la secuencia de aminoácidos del polipéptido de pepsina de Endothia que se muestra en la Figura 5 en el presente documento.

Polímero

60 Como se ha discutido anteriormente - el polímero de la composición de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche líquida del primer aspecto, la composición de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche seca del segundo aspecto y/o el proceso para aislar una enzima proteasa aspártica para coagulación de leche de interés del quinto aspecto es un polímero que tiene las siguientes características (a), (b) y (c) u opcionalmente (D):

65 (a): el polímero es un polímero de al menos un monómero seleccionado entre el grupo de monómeros que consiste en: óxido de etileno, vinilpirrolidona, alcohol vinílico, acetato de vinilo, acrilonitrilo, acrilato y metacrilato; y

- (b): el polímero es un polímero con una masa molecular de 200 g/mol a 50.000 g/mol; y
(c): el polímero es un polímero con un número de monómeros/elementos de repetición (también denominado número "n") de $n = 5$ a $n = 1250$; y
(D): opcionalmente el polímero que tiene las características (a), (b) y (c) mencionadas anteriormente puede ser un polímero sustituido que comprende uno o más compuesto(s) sustituyente(s) de los monómeros de la característica (a) y si el polímero es un polímero sustituido la masa molecular del polímero sustituido como tal está dentro del intervalo de la característica (b) y la masa molecular del compuesto(s) sustituyente(s) es menor que la masa molecular de la parte polimérica del polímero sustituido.
- 5
- 10 La discusión de realizaciones/ejemplos específicos de los polímeros pertinentes que siguen a continuación en el presente documento es pertinente para todos los aspectos de la invención tal como se discute en el presente documento.
- 15 [Como lo entiende la persona con experiencia en el presente contexto - un polímero de al menos dos o más monómeros de la característica (a) es lo que en la técnica se puede denominar un heteropolímero o copolímero que es un polímero obtenido a partir de dos (o más) especies monoméricas, a diferencia de un homopolímero en el que solo se usa un monómero - es decir, un polímero de solo un monómero de la característica (a) es lo que en la técnica se puede denominar un homopolímero.
- 20 Con respecto a la característica (a) puede ser preferible que el polímero sea un polímero de dos monómeros diferentes seleccionados entre el grupo de la característica (a).
- Preferiblemente, el polímero es un homopolímero.
- 25 Con respecto a la característica opcional (D) - es preferible que la masa molecular del compuesto(s) sustituyente(s) sea al menos 2 veces menor que la masa molecular de la parte polimérica del polímero sustituido, más preferiblemente que la masa molecular del compuesto(s) sustituyente(s) sea al menos 4 veces menor que la masa molecular de la parte polimérica del polímero sustituido.
- 30 En el presente documento un polímero sustituido preferido es Brij 35, que tiene la estructura que se muestra en la Figura 1 en el presente documento.
- 35 El compuesto sustituyente puede ser por ejemplo un alquilo C_1-C_{25} (por ejemplo, alquilo sustituido C_1-C_{25}), alquenilo C_1-C_{25} (por ejemplo, alquenilo sustituido C_1-C_{25}) - en el que el alquilo y/o alquenilo puede ser por ejemplo lineal, cíclico o ramificado.
- Como se sabe en la técnica - los polímeros también pueden por ejemplo comprender, por ejemplo, Cl, Br y compuestos sustituyentes similares - es decir por ejemplo Cl, Br también pueden ser un ejemplo de compuestos sustituyentes en el presente documento.
- 40 Preferiblemente, el polímero es un polímero con una masa molecular de 750 g/mol a 30.000 g/mol, tal como por ejemplo un polímero con una masa molecular de 2000 g/mol a 20.000 g/mol o tal como por ejemplo un polímero con una masa molecular de 5000 g/mol a 15.000 g/mol.
- 45 Tal como lo entiende la persona experta en el presente contexto - una masa molecular preferida puede depender del tipo de polímero específico o de si es un polímero sustituido (por ejemplo, tal como Brij 35) o no.
- 50 Preferiblemente, el polímero es un polímero con un número de monómeros/elementos de repetición (también denominado número "n") de $n = 20$ a $n = 500$, tal como por ejemplo un polímero con un número de monómeros/elementos de repetición (también denominado número "n") de $n = 100$ a $n = 300$.
- Al igual que para la masa molecular y tal como lo entiende la persona con experiencia en el presente contexto - un número "n" preferido puede depender del tipo de polímero específico o de si es un polímero sustituido (por ejemplo, tal como Brij 35) o no.
- 55 El presente contexto - para la persona con experiencia se puede considerar trabajo de rutina identificar una masa molecular óptima y/o número "n" para un polímero pertinente en el presente documento en particular de interés con el fin de obtener la mejora de estabilidad que se describe en el presente documento con respecto a por ejemplo a una enzima proteasa aspártica para coagulación de leche de interés en particular (tal como por ejemplo quimosina bovina o de camello).
- 60 Preferiblemente, el polímero es Polietilenglicol (PEG) Polivinilpolipirrolidona, Alcohol polivinílico, Acetato de polivinilo, Poliacrilonitrilo, Poliacrilato, Polimetacrilato, polisorbato o Brij 35.
- 65 Cuando el polímero es Polietilenglicol (PEG), Polivinilpolipirrolidona, Alcohol polivinílico, Acetato de polivinilo, Poliacrilonitrilo, Poliacrilato o Polimetacrilato - es preferible que el polímero sea un polímero con una masa molecular

de 1500 g/mol a 40000 g/mol, tal como por ejemplo un polímero con una masa molecular de 2000 g/mol a 30000 g/mol o tal como por ejemplo un polímero con una masa molecular de 5000 g/mol a 15000 g/mol.

Preferiblemente el polímero es Polietilenglicol (PEG), polisorbato 20 o Brij 35.

5 Con respecto a PEG puede ser preferible que el polímero sea un polímero con una masa molecular de 1500 g/mol a 40000 g/mol, tal como por ejemplo un polímero con una masa molecular de 2000 g/mol a 30000 g/mol o más preferiblemente un polímero con una masa molecular de 5000 g/mol a 15000 g/mol.

10 Primer y/o Segundo aspecto - Una composición de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche líquida y/o seca

Como se ha discutido anteriormente - el primer aspecto de la invención se refiere a una composición de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche líquida que comprende:

15 (i): enzima proteasa aspártica para coagulación de leche con una fuerza de 25 IMCU/g de la composición a 30000 IMCU/g de la composición;
(ii): polímero en una concentración de 1 ppm a 5000 ppm (p/p), y
20 (iii) una sal en una concentración de 1 a 350 g/kg;

y en la que el pH de la composición es de 2 a 8;

y en la que el polímero es un polímero que tiene las siguientes características (a), (b) y (c) y opcionalmente (D): [como se describe en el presente documento].

25 Como se ha discutido anteriormente -el segundo aspecto de la invención se refiere a una composición de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche granulada seca que comprende:

30 (i): enzima proteasa aspártica para coagulación de leche con una fuerza de 25 IMCU/g de la composición a 30000 IMCU/g de la composición;
(ii): polímero en una concentración de 1 ppm a 5000 ppm (p/p), y
(iii) una sal;

y en la que el pH de la composición suspendida en agua es de 2 a 8;

35 y en la que el polímero es un polímero que tiene las características (a), (b) y (c) y opcionalmente (D): [como se describe en el presente documento].

Tanto para la composición líquida como para la seca - los ejemplos/realizaciones preferidos de enzimas proteasas aspárticas para coagulación de leche se han descrito anteriormente.

40 Tanto para la composición líquida como para la seca - los ejemplos/realizaciones preferidos de polímero se han descrito anteriormente.

Tanto para la composición líquida como para la seca - es preferible que la fuerza enzimática en el apartado (i) sea una fuerza de 100 IMCU/g de la composición a 10000 IMCU/g de la composición, más preferiblemente una fuerza de 500 IMCU/g de la composición a 6000 IMCU/g de la composición.

45 Tanto para la composición líquida como para la seca - es preferible que la concentración del polímero en el apartado (ii) sea una concentración de 1 ppm a 5000 ppm (p/p).

50 Tanto para la composición líquida como para la seca - es preferible que la concentración del polímero en el apartado (ii) sea una concentración de 1 ppm a 3000 ppm (p/p).

Tanto para la composición líquida como para la seca - es preferible que la concentración del polímero en el apartado (ii) sea una concentración de 10 ppm a 5000 ppm (p/p), más preferiblemente sea una concentración de 50 ppm a 4000 ppm (p/p) y incluso más preferiblemente sea una concentración de 100 ppm a 3000 ppm (p/p).

55 Puede ser pertinente que la concentración del polímero en el apartado (ii) sea una concentración de 160 ppm a 5000 ppm (p/p), tal como por ejemplo de 175 ppm a 4000 ppm (p/p). Puede ser pertinente que la concentración del polímero en el apartado (ii) sea una concentración de 5 ppm a 145 ppm (p/p), tal como por ejemplo de 10 ppm a 130 ppm (p/p).

Para la composición líquida - la sal en el apartado (iii) está preferiblemente en una concentración de 10 a 300 g/kg, más preferiblemente está en una concentración de 25 a 250 g/kg.

65 Como sabe la persona con experiencia - para la composición seca, la concentración de sal el apartado (iii) puede ser relativamente elevada - tal como por ejemplo de un 50 % (p/p) a un 99,9 % (p/p) o tal como por ejemplo de un 80 %

(p/p) a un 99 % (p/p).

Tanto para la composición líquida como para la seca - es preferible que la sal sea una sal inorgánica - preferiblemente en la que la sal inorgánica se selecciona entre el grupo de NaCl, KCl, Na₂SO₄, (NH₄)₂SO₄, K₂HPO₄, KH₂PO₄, Na₂HPO₄ o NaH₂PO₄ una combinación de los mismos. Más preferiblemente, la sal es NaCl.

Tanto la composición líquida como la seca pueden comprender aditivos/compuestos adicionales tales como por ejemplo un conservante.

10 Como sabe la persona con experiencia - el conservante se puede añadir generalmente en una concentración suficiente como para prevenir el crecimiento microbiano durante periodo de validez del producto.

Los ejemplos de conservantes pueden ser por ejemplo ácidos orgánicos débiles tales como formiato, acetato, lactato, propionato, malato, benzoato, sorbato o fumarato. Como conservante también se pueden usar parabenos (ésteres de alquilo de para-hidroxibenzoato). Como conservantes también se han descrito glicerol o propanodiol.

Tanto para la composición líquida como la seca - es preferible que el pH sea de 3 a 7, más preferiblemente que el pH sea de 4 a 6,5 e incluso más preferiblemente que el pH sea de 5 a 6.

20 Preferiblemente, la composición líquida es una composición acuosa, por ejemplo una solución acuosa. Como se usa en el presente documento, una composición acuosa o una solución acuosa incluye cualquier composición o solución que comprenda agua, por ejemplo al menos un 20 % en peso de agua, por ejemplo al menos un 40 % en peso de agua. Preferiblemente, una composición de acuerdo con la invención comprende al menos un 50, 60, 70 o un 80 % en peso de agua. Más preferiblemente, la composición de la invención comprende al menos un 85, 90 o un 95 % en peso de agua.

Como se discute en el Ejemplo 2 de trabajo en el presente documento y tal como se puede observar en la Figura 2 en el presente documento - usando un polímero como se describe en el presente documento fue posible obtener composiciones de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche con un aumento significativo de la actividad específica de la enzima.

Como se puede observar en la Figura 2A en el presente documento - usando un polímero como se describe en el presente documento fue posible obtener composiciones de enzima de camello, en las que la actividad específica de las enzimas era superior a 350 IMCU/mg de proteína total y en el experimento comparativo (es decir, sin adición de polímero) la actividad específica de la enzima era solo de aproximadamente 200 IMCU/mg de proteína total.

Como se puede observar en la Figura 2B en el presente documento - usando un polímero como se describe en el presente documento fue posible obtener composiciones de enzima bovina, en las que la actividad específica de las enzimas era superior a 150 IMCU/mg de proteína total y en el experimento comparativo (es decir, sin adición de polímero) la actividad específica de la enzima era solo de aproximadamente 125 IMCU/mg de proteína total.

Por consiguiente, en una realización preferida tanto para la composición líquida como para la seca:

45 - la actividad específica de la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche es superior a 300 IMCU/mg de proteína enzima proteasa aspártica para coagulación de leche total, más preferiblemente la actividad específica de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche es superior a 350 IMCU/mg de proteína enzima proteasa aspártica para coagulación de leche total, en la que la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche es quimosina de *Camelius dromedarius* que comprende la secuencia de aminoácidos del polipéptido que se muestra en la Figura 5 en el presente documento (denominada "Quimosina_camello") o una variante de quimosina de *Camelius dromedarius*, en la que la variante comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90 % (preferiblemente al menos un 95 %, más preferiblemente al menos un 99 %) con la secuencia de aminoácidos del polipéptido de quimosina de camello que se muestra en la Figura 5 en el presente documento; o

55 - la actividad específica de la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche es superior a 150 IMCU/mg de proteína enzima proteasa aspártica para coagulación de leche total, más preferiblemente la actividad específica de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche es superior a 165 IMCU/mg de proteína enzima proteasa aspártica para coagulación de leche total, en la que la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche es quimosina bovina que comprende la secuencia de aminoácidos del polipéptido que se muestra en la Figura 5 en el presente documento (denominada "Quimosina_bovina") o una variante de quimosina bovina, en la que la variante comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90 % (preferiblemente al menos un 95 %, más preferiblemente al menos un 99 %) con la secuencia de aminoácidos del polipéptido de quimosina bovina que se muestra en la Figura 5 en el presente documento.

Puede ser preferible que la composición líquida como se describe en el presente documento tenga un peso total de 10 g a 10000 kg, tal como por ejemplo de 100 g a 3000 kg.

Puede ser preferible que la composición granulada seca como se describe en el presente documento tenga un peso

total de 0,25 g a 200 kg, tal como por ejemplo de 0,5 g a 50 kg.

Es preferible que la composición sea una composición de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche líquida como se describe en el presente documento.

5

Tercer aspecto - Un método para almacenamiento

Como se ha discutido anteriormente - el tercer aspecto de la invención se refiere a un método para almacenamiento de una enzima proteasa aspártica para coagulación de leche, en el que el método comprende las siguientes etapas:

10

- (a): proporcionar una composición de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche del primer o el segundo aspecto o cualquier realización pertinente del mismo en el presente documento; y
- (b): almacenar la composición durante un periodo de 90 días a 2000 días a una temperatura de -10 °C a 50 °C.

15

Preferiblemente, la temperatura de almacenamiento en la etapa (b) es una temperatura de 4 °C a 38 °C.

Puede ser preferible que el periodo de almacenamiento en la etapa (b) sea un periodo de 180 días a 500 días.

Cuarto aspecto - Un método para un método para la fabricación de un alimento o producto alimentario

20

Como se ha discutido anteriormente - una composición de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche como se describe en el presente documento se puede usar de acuerdo con la técnica - por ejemplo para preparar un producto a base de leche de interés (tal como por ejemplo un producto de queso).

25

Como se ha discutido anteriormente - el cuarto aspecto de la invención se refiere a un método para la fabricación de un alimento o producto alimentario que comprende la adición de una cantidad eficaz de una composición de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche de cualquiera del primer o el segundo aspecto o cualquier realización pertinente del mismo en el presente documento al alimento o ingrediente(s) alimentario(s) y llevar a cabo etapas de fabricación adicionales para obtener el alimento o producto alimentario.

30

Preferiblemente, el alimento o producto alimentario es un producto a base de leche y en el que el método comprende la adición de una cantidad eficaz de la variante polipeptídica de quimosina aislada como se describe en el presente documento a la leche y llevar a cabo etapas de fabricación adicionales para obtener el producto a base de leche.

35

La leche puede ser por ejemplo leche de oveja, leche de cabra, leche de búfalo, leche de yak, leche de llama, leche de camello o leche de vaca.

El producto a base de leche puede ser por ejemplo un producto de leche fermentada, un queso fresco batido o un queso.

40

Puede ser preferible que el método para la fabricación de un alimento o producto alimentario del cuarto aspecto o realizaciones pertinentes del mismo en el presente documento sea un método, en el que una composición de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche se ha almacenado primero de acuerdo con el método para almacenamiento de una enzima proteasa aspártica para coagulación de leche del tercer aspecto y a partir de ese momento se añade al alimento o ingrediente(s) alimentario(s) de acuerdo con el método para la fabricación de un alimento o producto alimentario del cuarto aspecto.

45

Quinto aspecto - Un proceso para aislar una enzima proteasa aspártica para coagulación de leche

50

Como se ha discutido anteriormente - el quinto aspecto de la invención se refiere a un proceso para aislar una enzima proteasa aspártica para coagulación de leche de interés a partir de un medio acuoso que comprende tal enzima de interés, en el que el método comprende las etapas de:

55

- (i): obtener una muestra acuosa que consiste en un número de componentes incluyendo la proteasa aspártica;
- (ii): añadir polímero en una concentración de 1 ppm a 5000 ppm a la muestra acuosa de la etapa (i) para obtener una muestra que contiene polímero; y
- (iii): aislar la proteasa aspártica de la muestra que contiene polímero de la etapa (ii) y de ese modo obtener la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche aislada de interés;

60

en el que el polímero es un polímero tiene las características (a), (b) y (c) y opcionalmente (D) del primer aspecto.

Para el proceso del quinto aspecto - los ejemplos/realizaciones preferidos de enzimas proteasas aspárticas para coagulación de leche se han descrito anteriormente.

65

Para el proceso del quinto aspecto - los ejemplos/realizaciones preferidos de polímero se han descrito anteriormente.

Es preferible que el polímero se añada en la etapa (ii) en una concentración de polímero de 10 ppm a 5000 ppm (p/p), más preferiblemente en una concentración de 100 ppm a 4000 ppm (p/p) e incluso más preferiblemente se encuentra en una concentración de 300 ppm a 3000 ppm (p/p).

5 El término "aislamiento" en la etapa (iii) se debería entender tal como lo podría entender la persona con experiencia en el presente contexto - es decir, que la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche aislada obtenida en la etapa (iii) está más aislada (es decir más pura) en comparación con la muestra acuosa que consiste en un número de componentes incluyendo la proteasa aspártica de la etapa (i).

10 Como un ejemplo - la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche aislada obtenida en la etapa (iii) puede tener una pureza por ejemplo de al menos un 60 % en p/p de proteína total (es decir, un 60 % en p/p de proteína total en la composición aislada es la enzima proteasa aspártica coagulante aislada). Incluso puede estar más purificada - es decir, al menos un 90 % en p/p de proteína total.

15 Preferiblemente, el polímero es Polietilenglicol (PEG), Polivinilpirrolidona, Alcohol polivinílico, Acetato de polivinilo, Poliacrilonitrilo, Poliacrilato, Polimetacrilato o Brij 35.

20 Cuando el polímero es Polietilenglicol (PEG), Polivinilpirrolidona, Alcohol polivinílico, Acetato de polivinilo, Poliacrilonitrilo, Poliacrilato o Polimetacrilato - es preferible que el polímero sea un polímero con una masa molecular de 1500 g/mol a 40000 g/mol, tal como por ejemplo un polímero con una masa molecular de 2000 g/mol a 30000 g/mol o tal como por ejemplo un polímero con una masa molecular de 5000 g/mol a 15000 g/mol.

Preferiblemente el polímero es Polietilenglicol (PEG) o Brij 35.

25 Con respecto a PEG, puede ser preferible que el polímero sea un polímero con una masa molecular de 1500 g/mol a 40000 g/mol, tal como por ejemplo un polímero con una masa molecular de 2000 g/mol a 30000 g/mol o más preferiblemente un polímero con una masa molecular de 5000 g/mol a 15000 g/mol.

30 En una realización preferida - la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche aislada en la etapa (iii) es una enzima que:

- tiene una actividad específica de la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche superior a 300 IMCU/mg de proteína enzima proteasa aspártica para coagulación de leche total, más preferiblemente la actividad específica de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche es superior a 350 IMCU/mg de proteína enzima proteasa aspártica para coagulación de leche total, en la que la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche es quimosina de *Camelius dromedarius* que comprende la secuencia de aminoácidos del polipéptido que se muestra en la Figura 5 en el presente documento (denominada "Quimosina_camello") o una variante de quimosina de *Camelius dromedarius*, en la que la variante comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90 % (preferiblemente al menos un 95 %, más preferiblemente al menos un 99 %) con la secuencia de aminoácidos del polipéptido de quimosina de camello que se muestra en la Figura 5 en el presente documento; o

45 - tiene una actividad específica de la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche superior a 150 IMCU/mg de proteína enzima proteasa aspártica para coagulación de leche total, más preferiblemente la actividad específica de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche es superior a 165 IMCU/mg de proteína enzima proteasa aspártica para coagulación de leche total, en la que la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche es quimosina bovina que comprende la secuencia de aminoácidos del polipéptido que se muestra en la Figura 5 en el presente documento (denominada "Quimosina_bovina") o una variante de quimosina bovina, en la que la variante comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90 % (preferiblemente al menos un 95 %, más preferiblemente al menos un 99 %) con la secuencia de aminoácidos del polipéptido de quimosina bovina que se muestra en la Figura 5 en el presente documento.

50 La muestra acuosa que consiste en un número de componentes incluyendo la proteasa aspártica de la etapa (i) se puede obtener mediante producción recombinante de la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche en una célula hospedadora de producción (por ejemplo, una célula hospedadora de producción eucariota).

55 Como se sabe en la técnica - antes de la purificación corriente abajo de, por ejemplo, la enzima de interés, normalmente se eliminan/separan las células hospedadoras de producción y otro material no deseado en el medio de fermentación (mediante, por ejemplo, centrifugación y/o filtración) - es decir, para obtener una muestra que comprende la enzima de interés sin demasiados componentes no deseados tales como por ejemplo células hospedadoras de producción. Como se sabe en la técnica - en ocasiones esto se puede denominar primer filtrado no purificado - esta expresión se puede usar en el presente documento y puede ser un ejemplo de una muestra acuosa pertinente en el presente documento que consiste en un número de componentes incluyendo la proteasa aspártica de la etapa (i).

65 El documento WO02/36752A2 (Chr. Hansen) describe un método recombinante para producir quimosina de *Camelius dromedarius* (Quimosina de camello) usando células de *Aspergillus* (preferiblemente *Aspergillus niger*)

como células hospedadoras de producción.

Por consiguiente, puede ser preferible que la célula hospedadora de producción recombinante sea una célula de *Aspergillus* (preferiblemente *Aspergillus niger*).

5 La pepsina de mucor obtenida a partir de *Rhizomucor miehei* se puede producir preferiblemente mediante el uso de *Rhizomucor miehei* como célula hospedadora de producción.

10 Puede ser preferible que el proceso del quinto aspecto se refiera a un proceso con la condición de que el proceso no sea un proceso, en el que se añaden PEG y sal inorgánica a la muestra acuosa de la etapa (i) con el fin de formar un sistema de dos fases líquida-líquida (acuoso) y a continuación recuperar/aislar la proteasa aspártica de la fase de PEG. Como se ha discutido anteriormente - el documento US5139943 describe un método que se puede ver que se basa en el uso de tal sistema de dos fases líquida-líquida (acuoso).

15 En una realización preferida, el proceso del quinto aspecto es un proceso, en el que la etapa de aislamiento (iii) comprende las siguientes etapas:

(A): aplicar el polímero que contiene muestra de la etapa (ii) sobre una fase sólida que comprende una matriz de base sólida que contiene ligandos que comprenden una parte hidrófoba con el fin de obtener adsorción de la proteasa aspártica de interés al ligando; y

20 (B): eluir la proteasa aspártica de interés de la fase sólida con el fin de recuperar la proteasa aspártica y de ese modo obtener la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche aislada purificada de interés.

25 En una realización preferida, el proceso del quinto aspecto es un proceso, en el que las etapas (i) a (iii) del primer aspecto comprenden:

(i): la muestra acuosa que consiste en un número de componentes incluyendo la proteasa aspártica de la etapa (i) del quinto aspecto se aplica sobre una fase sólida que comprende una matriz de base sólida que contiene ligandos que comprenden una parte hidrófoba con el fin de obtener adsorción de la proteasa aspártica de interés al ligando;

30 (ii): la adición del polímero en la etapa (ii) del quinto aspecto esa adición al tampón de elución; y

(iii): la etapa de aislamiento (iii) del quinto aspecto comprende eluir la proteasa aspártica de interés de la fase sólida con el fin de recuperar la proteasa aspártica y de ese modo obtener la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche aislada purificada de interés.

35 Las dos realizaciones preferidas mencionadas inmediatamente antes - se pueden visualizar como con respecto a procedimientos de aislamiento por cromatografía (por ejemplo, cromatografía en columna). Dado que la cromatografía es bien conocida por la persona con experiencia por lo tanto no es necesario describir procedimientos de cromatografía como tal con grandes detalles en el presente documento.

40 La expresión "matriz de base sólida" se refiere al material de estructura principal sólido que contiene grupos funcionales reactivos que permiten la unión covalente del ligando a dicho material de estructura principal. En el presente documento esta expresión también se puede denominar matriz de soporte sólido.

45 Como se sabe en la técnica - el material de estructura principal puede ser inorgánico tal como por ejemplo sílice, u orgánico. Los materiales de estructura principal orgánicos que son útiles en el presente documento incluyen como ejemplos celulosa y derivados de la misma, agarosa, dextrano, polímeros tales como por ejemplo poliacrilatos, poliestireno, poliacrilamida, polimetacrilato, copolímeros.

50 Como se sabe en la técnica - un ejemplo de una matriz de base sólida también puede ser una denominada resina - como se sabe en la técnica este término se pueden usar en relación a cromatografía de intercambio iónico (IEC).

55 Como se sabe en la técnica - la matriz de base sólida pueden ser preferiblemente partículas - por ejemplo la matriz de base sólida puede comprender partículas con un tamaño de partícula de menos de 750 μm o partículas con un tamaño de partícula de menos de 100 μm .

Los grupos funcionales reactivos de la matriz de soporte sólido que permitan la unión covalente del grupo ligando Se conocen bien en la técnica e incluyen por ejemplo hidroxilo, carboxilo, tiol y amino.

60 Como se usa en el presente documento, el término "ligando" se refiere a una parte hidrófoba (como alternativa denominado grupo) y un brazo espaciador para unión por vía covalente del ligando a la matriz de base sólida. El brazo espaciador puede ser cualquier grupo o sustituyente que sea capaz de unirse de forma covalente el grupo/parte seleccionados a la matriz de base sólida. Los brazos espaciadores de ese tipo se conocen bien en la técnica e incluyen por ejemplo grupos alquilenos, grupos aromáticos, grupos alquilaromáticos, grupos amido, grupos amino, grupos urea, grupos carbamato.

65

El medio de carga acuoso que comprende la enzima de interés se pone en contacto con los ligandos como se describe en el presente documento en condiciones que permitan que la enzima de interés se una/adsorba a los ligandos. La persona con experiencia sabe cómo ajustar las condiciones (por ejemplo, ajustar el pH tal como en el intervalo de 3-10 incluyendo el intervalo de 4-8 y/o ajustar el caudal) con el fin de obtener la adsorción apropiada de una enzima de interés a un ligando de interés.

Como tal para la persona con experiencia esta etapa es una etapa que se realiza de forma rutinaria y la persona con experiencia conoce un número de diferentes ligandos pertinentes en el presente documento (véase por ejemplo el artículo de revisión: Yang *et al*, Journal of Chromatography A, 1218 (2011) 8813-8825).

La persona con experiencia conoce una serie de técnicas de purificación/separación pertinentes en el presente documento, en las que se aplica un medio pertinente en el presente documento pertinente que comprende la enzima de interés sobre una fase sólida que comprende una matriz de base sólida que contiene ligandos pertinentes en el presente documento para obtener adsorción de la enzima de interés al ligando - por ejemplo, mediante el uso de al menos una técnica de purificación seleccionada entre el grupo que consiste en: cromatografía, cromatografía en columna, adsorción en lecho, adsorción en lecho expandido (EBA), adsorción discontinua, adsorción sobre membrana y cromatografía de intercambio iónico (IEC).

En el presente documento puede ser preferible el uso de la técnica de purificación de adsorción en lecho expandido (EBA).

Todas estas técnicas de purificación son muy conocidas por la persona con experiencia - por consiguiente para la persona con experiencia es trabajo de rutina unir de forma adecuada una enzima de interés a un ligando usado adecuado específico y realizar de forma adecuada la etapa de elución para obtener de ese modo la enzima purificada/aislada de interés.

Dicho en otras palabras - para la persona con experiencia es trabajo de rutina identificar el disolvente, tampones, adecuados, etc., con el fin de obtener una adsorción apropiada de la enzima de interés al ligando y la elución apropiada de la enzima de interés para obtener ese modo la enzima purificada/aislada de interés.

Por consiguiente, no se cree que sea necesario describir estas etapas con muchos detalles en el presente documento.

Como se sabe en la técnica - el término "cromatografía" se refiere a un método físico de separación en el que los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una que se denomina estacionario (fase estacionaria) mientras que la otra (la fase móvil) se mueve en una dirección definida.

Como se sabe en la técnica - la expresión "cromatografía en columna" se refiere a una técnica de separación en la que el lecho estacionario está dentro de un tubo.

Como se sabe en la técnica - la expresión "adsorción en lecho expandido (EBA)" se refiere a una técnica de cromatografía preparativa que hace posible el procesamiento de líquidos viscosos y con partículas.

Los principios de la unión de proteínas en EBA son los mismos que en la cromatografía en columna clásica y se pueden usar los ligandos comunes para cromatografía de intercambio iónico, interacción hidrófoba, y por afinidad. Cuando la cromatografía en columna clásica usa una fase sólida formada por un lecho empaquetado, la EBA usa partículas en estado fluidizado. La resina de EBA contiene partículas de tamaño y densidad variables que da como resultado un gradiente de tamaño de partícula cuando se expande y cuando el hecho está en su estado expandido, se forman bucles locales. Las partículas tales como células completas o residuos celulares, que pueden obstruir una columna de lecho empaquetado, pasan fácilmente a través de un lecho fluidizado. Por lo tanto EBA se puede usar en caldos de cultivo en bruto o suspensiones de células rotas, evitando de ese con las etapas iniciales de eliminación tales como centrifugación y filtración, que pueden ser necesarias cuando se usan lechos empaquetados.

Las expresiones "adsorción en lecho", "adsorción discontinua" y "adsorción sobre membrana" son bien conocidas y evidentes para la persona con experiencia en el presente contexto.

Como se sabe en la técnica - una parte hidrófoba de un ligando puede ser por ejemplo un grupo alifático o un grupo aromático.

El grupo alifático puede ser por ejemplo un grupo alquilo con diferentes longitudes por ejemplo un grupo alquilo de C₂ a C₄₀ o un grupo alquilo de C₄ a C₃₀;

un grupo alqueno con diferentes longitudes por ejemplo un grupo alqueno de C₂ a C₄₀ o un grupo alqueno de C₄ a C₃₀ o por ejemplo

un grupo alquino con diferentes longitudes por ejemplo un grupo alquino de C₂ a C₄₀ o un grupo alquino de C₄ a C₄₀.

El grupo aromático puede ser por ejemplo un grupo fenilo o un grupo bencilo.

En una realización preferida la parte hidrófoba del ligando es un grupo bencilo.

En una realización preferida en el presente documento - los ligandos también comprenden una parte con carga positiva - es decir los ligandos comprenden una parte hidrófoba y una parte con carga positiva.

5 Como se sabe en la técnica - una parte con carga positiva de un ligando puede ser por ejemplo un grupo amino o por ejemplo un grupo amonio cuaternario.

Preferiblemente - la parte hidrófoba es un grupo bencilo y la parte con carga positiva es un grupo amino - es decir el ligando es bencilamina.

10 Ejemplos

EJEMPLO 1: Determinación de la actividad específica de coagulación de leche

4.1 Determinación de la actividad de coagulación

15 La actividad de coagulación de leche se determinó usando el método REMCAT, que es el método convencional desarrollado por la International Dairy Federation (método IDF).

La actividad de coagulación derecha se determina a partir del tiempo necesario para una floculación visible de un sustrato de leche convencional preparado a partir una leche en polvo con bajo contenido de grasa, con bajo calentamiento con una solución de cloruro cálcico de 0,5 g por litro (pH ≈ 6,5). El tiempo de coagulación de una muestra de enzima para coagulación de leche se compara con la de un patrón de referencia que tiene una actividad conocida de coagulación de la leche y que tiene la misma composición de la enzima mediante IDF Standard HOB como la muestra. Las muestras los patrones de referencia se midieron en idénticas condiciones químicas y físicas. Las muestras variables se ajustaron a aproximadamente 3 IMCU/ml usando un tampón de ácido acético 84 mM a pH 5,5. A partir de ese momento, se añadieron 200 µl de enzima a 10 ml de leche calentada previamente (32 °C) en un tubo de ensayo de vidrio colocado en un baño de agua, capaz de mantener una temperatura constante de 32 °C ± 1 °C con agitación constante. La actividad de coagulación de la leche total (fuerza) de una enzima para la coagulación de leche se calcula en Unidades Internacionales de Coagulación de Leche (IMCU) por ml con respecto a un patrón que tienen la misma composición de la enzima que la muestra de acuerdo con la fórmula:

30

$$\text{Fuerza en IMCU/ml} = \frac{\text{Spatrón} \times \text{Tpatrón} \times \text{Dmuestra}}{\text{Dpatrón} \times \text{Tmuestra}}$$

Spatrón: La actividad de coagulación de leche del patrón de referencia internacional para cuajo.

Tpatrón: Tiempo de coagulación en segundos obtenido para la disolución patrón.

35 Dmuestra: Factor de dilución para la muestra

Dpatrón: Factor de dilución para el patrón

Tmuestra: Tiempo de coagulación en segundos obtenido para la muestra de cuajo diluido a partir de la adición de enzima con respecto al tiempo de floculación.

40 4.2 Determinación del contenido de proteína total

El contenido de proteína total se determinó usando el Kit de Ensayo BCA Pierce de Proteína de Thermo Scientific siguiendo las instrucciones de los proveedores.

45 4.3 Cálculo de la actividad de coagulación específica

La actividad de coagulación específica (IMCU/mg de proteína total) se determinó dividiendo la actividad de coagulación (IMCU/ml) entre el contenido de proteína total (mg de proteína total por ml).

50 **EJEMPLO 2: Adición de PEG o Brij-35 a tampón de elución**

Quimosina bovina o quimosina de camello se expresaron de forma recombinante en *Aspergillus niger* (aproximadamente como se describe en el documento WO02/36752A2).

55 Las enzimas se purificaron para una aproximación de extracción en fase sólida usando un ligando de bencilamina unido por vía covalente a agarosa (similar alegando de bencilamina que se describe en el documento WO01/58924A2).

60 Una placa de filtro de 96 pocillos equipada con un filtro de PE de 25 µm y un volumen de pocillo de 2 ml se empaquetó con Fastline 1300 de Upfront Chromatography, Dinamarca.

Los pocillos se empaquetaron con resina para dar una altura de lecho de 6 - 8 mm en todos los pocillos. La resina en todos los pocillos se equilibró con 5 ml de malonato sódico 20 mM a pH 5,7.

5 El sobrenadante de los cultivos se ajustó a pH 5,7 mezclando 3 ml de sobrenadante con 0,5 ml de malonato sódico 2 M a pH 5,7. A continuación la muestra de 3,5 ml se filtró a través de un filtro de 8 µm para retirar partículas y se cargó a 96 pocillos individuales de la placa. Después de la carga, la resina se lavó con 5 ml de malonato 20 mM, tampón de NaCl 500 mM a pH 5,7 y se permitió su desarrollo casi hasta sequedad. La resina se eluyó con alícuotas de 500 µl de ácido malónico 20 mM a pH 2.5, NaCl 100 mM, glicerol al 5 % y se recogió en viales.

10 En algunos experimentos se añadió PEG-8000 o Brij-35 al tampón de elución hasta una concentración final de un 0,05 - 0,25 % en p/p.

En otros experimentos se añadió PEG-8000 o Brij-35 a la muestra antes de que las enzimas se unieran a la resina hasta una concentración final de un 0,05 - 0,25 % en p/p.

15 En experimentos de control no se añadió PEG-8000 o Brij-35.

Inmediatamente después de la recogida, se añadió malonato di-sódico 1,5 M al eluato para ajustar el pH a 5,4 - 5,8.

20 Las muestras analizaron para concentración de proteína y actividad de coagulación de leche en 1 día después del aislamiento.

La concentración de proteína en las fracciones recogidas se analizó usando el Kit de Ensayo BCA Pierce de Proteína de Thermo Scientific.

25 Resultados:

La Figura 2 muestra los resultados de la adición de un 0,1 % de PEG 8000 o Brij 35 al tampón de elución en comparación con experimentos de control sin adición de PEG 800 o Brij 35.

30 Como se puede observar en la figura 2 - las muestras que contenían PEG 8000 o Brij 35 presentaban un aumento de la actividad específica de dos veces con respecto a la muestra de control purificada sin adición de PEG/Brij 35.

35 En experimentos en los que se añadió PEG-8000 o Brij-35 a la muestra antes de que las enzimas se unieran a la resina se obtuvieron resultados positivos similares.

Al igual que en la figura 2 se obtuvieron resultados positivos mediante la adición de un 0,05 % en p/p de PEG-8000 o Brij-35 o mediante la adición de un 0,25 % en p/p de PEG-8000 o Brij-35.

40 Conclusiones:

Los resultados demostraron que las muestras purificadas con adición de PEG 8000 o Brij 35 presentaban un aumento de la actividad específica de dos veces con respecto a la muestra de control purificada sin adición de PEG/Brij 35.

45 Se cree que el eluato/muestras contienen PEG 8000/Brij 35.

EJEMPLO 3: Adición de PEG a la formulación (después de purificación)

50 La composición de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche líquida que comprende enzima proteasa aspártica para coagulación de leche a una fuerza de aproximadamente 1100 IMCU/g se obtuvo.

Se obtuvieron composiciones para quimosina bovina, quimosina de camello y pepsina de mucor (es decir, 3 composiciones diferentes).

55 A cada una de las composiciones se le añadió PEG 8000 hasta un contenido de un 0,015 % p/p (150 ppm en p/p). Las composiciones de control eran sin adición de PEG 8000.

Las composiciones se almacenaron a 5 °C y 37 °C durante 6 meses y se analizaron para actividad de coagulación de leche a intervalos regulares.

60 Los resultados han demostrado que la adición de PEG ha aumentado a la estabilidad durante el almacenamiento a más largo plazo después de 6 meses de almacenamiento de las composiciones de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche líquidas sometidas a ensayo - es decir, estas composiciones tenían una actividad en IMCU/g más elevada.

65 **EJEMPLO 4: Adición de PEG o polisorbato 20 a la formulación (después de purificación)**

Las formulaciones líquidas de enzimas industriales se someten a fuerzas físicas a partir de operaciones unitarias tales como bombeo, agitación y filtración sobre membranas. A esto también puede contribuir el transporte de vertidos contenidos parcialmente cargados alrededor de una formulación líquida. La tensión de cizalladura y el aumento de la exposición de la enzima a la superficie de contacto agua-aire puede inducir desnaturalización y pérdida simultánea de actividad enzimática.

La estabilidad física de una muestra de enzima o proteína se puede someter a ensayo mediante una agitación repetible de una muestra en un tubo de ensayo que tiene un espacio de cabeza elevado con respecto a una proporción de volumen. La estabilidad de diferentes proteasas aspárticas con respecto a la agitación se investigó mediante el volteo de una muestra de 2 ml cargada en un tubo de 10 ml en dispositivo giratorio durante 1 hora. Para cada solución la actividad de coagulación de leche relativa se midió después de 1 hora inversión vertical y se comparó con un control no invertido que tenía exactamente la misma composición. Los resultados se expresaron como "actividad retenida" que se obtiene dividiendo la actividad de la muestra invertida entre la actividad de la muestra de control de invertida.

Resultados:

Se encontró que PEG 8000 añadido a una concentración de un 0,015 % (150 ppm) tenía un efecto notablemente protector contra la agitación de todas las proteasas aspárticas sometidas a ensayo (Tabla x). El efecto protector de PEG 800 era más intenso para quimosina bovina y para quimosina de camello en las que la pérdida de actividad sin PEG 8000 añadido era de un 11 % y de un 35 %, respectivamente. Cuando PEG 8000 se añadió a muestras de quimosina bovina y quimosina de camello no se produjo pérdida de actividad después de la agitación de las muestras. Las muestras de quimosina de camello sin PEG, un precipitado de color blanco se observó después de agitación. No había precipitado en las muestras de quimosina de camello a las que se añade PEG después de agitación. Esto sugiere que la pérdida de actividad se debía a la agregación de la proteína después de desnaturalización y no a la adsorción superficial de la enzima con respecto a la superficie del tubo de ensayo. Para pepsina de mucor había un efecto protector menor de PEG 8000 en la estabilidad física.

El impacto de PEG 8000 en la estabilidad de quimosina de camello con respecto a la agitación se comparó con los tensioactivos lecitina de soja, polisorbato 20 y monoestearato de glicerol. A partir de la Tabla y se puede observar que el efecto del polisorbato 20 era similar al efecto de PEG 8000. La actividad detenida en las muestras de quimosina de camello a la que se añade cualquiera de lecitina de soja o monoestearato de glicerol era similar a la muestra de control sin tratar (sin adición). Esto sugiere que el efecto estabilizante contra la agitación observada en este ejemplo no se debe a la prevención de la adsorción superficial por tensioactivos, sino a una característica relacionada con el elemento estructural de polioxietileno contenido en PEG 8000 y Polisorbato 20.

Tabla x: Actividad retenida de muestras de proteasas aspárticas sometidas a agitación

Enzima	Adición de un 0,015 % de PEG 800	Actividad retenida
Quimosina bovina (CHY-MAX)	-	89 %
	+	101 %
Quimosina de camello (CHY-MAX M)	-	65 %
	+	100 %
Pepsina de Mucor XL (Hannilase XP)	-	96 %
	+	98 %
Pepsina de Mucor L (Hannilase I)	-	97 %
	+	102 %

Tabla y: Actividad retenida de muestras de quimo sino de camello sometidas a agitación

Enzima	Actividad retenida
Sin adición	76 (7) %
PEG (0,015 %)	98 (1) %
Lecitina de soja (0,015 %)	73 (0) %
Lecitina de soja (0,075 %)	69 (2) %
Polisorbato 20 (0,015 %)	100 (0) %

Enzima	Actividad retenida
Polisorbato 20 (0,075 %)	100 (1) %
Monoestearato de glicerol (0,015 %)	75 (3) %
Monoestearato de glicerol (0,075 %)	71 (3) %

Conclusiones:

5 Los resultados demuestran que PEG 8000 tiene un efecto estabilizante en proteasas aspárticas contra las fuerzas físicas que resultan de la agitación de una muestra líquida. Además, se muestra que otros compuestos que contienen un elemento estructural de polioxietileno, tal como polisorbato 20, tienen efectos estabilizantes similares.

REFERENCIAS

- 10 1: Documento EP2333056A1 (DSM, Fecha de presentación 12.04.2007)
- 2: Documento WO2012/127005A1 (DSM)
- 3: Documento US5139943 (Genencor, Publicado el 18 de agosto de 1992)
- 15 4: Documento US7998705B2 (Fujifilm, Publicado el 16 de agosto de 2011)
- 5: Documento US2011/0008846A1 (Qiagen)

REIVINDICACIONES

1. Una composición de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche líquida que comprende:

- 5 (i): enzima proteasa aspártica para coagulación de leche con una fuerza de 25 IMCU/g de la composición a 30000 IMCU/g de la composición;
 (ii): polímero en una concentración de 1 ppm a 5000 ppm (p/p), y
 (iii) una sal en una concentración de 1 a 350 g/kg;

10 y en la que el pH de la composición es de 2 a 8;

y en la que el polímero es un polímero que tiene las siguientes características (a), (b) y (c):

15 (a): el polímero es un polímero de al menos un monómero seleccionado entre el grupo de monómeros que consiste en: óxido de etileno, vinilpirrolidona, alcohol vinílico, acetato de vinilo, acrilonitrilo, acrilato y metacrilato; y

(b): el polímero es un polímero con una masa molecular de 200 g/mol a 50000 g/mol; y

(c): el polímero es un polímero con un número de monómeros/elementos de repetición (también denominado número "n") de $n = 5$ a $n = 1250$; y

20 (D): opcionalmente el polímero que tiene las características (a), (b) y (c) mencionadas anteriormente puede ser un polímero sustituido que comprende uno o más compuesto(s) sustituyente(s) de los monómeros de la característica (a) y si el polímero es un polímero sustituido la masa molecular del polímero sustituido como tal está dentro del intervalo de la característica (b) y la masa molecular del compuesto(s) sustituyente(s) es menor que la masa molecular de la parte polimérica del polímero sustituido.

25

2. Una composición de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche granulada seca que comprende:

(i): enzima proteasa aspártica para coagulación de leche con una fuerza de 25 IMCU/g de la composición a 30000 IMCU/g de la composición;

30 (ii): polímero en una concentración de 1 ppm a 5000 ppm (p/p), y

(iii) una sal;

y en la que el pH de la composición suspendida en agua es de 2 a 8;

35 y en la que el polímero es un polímero que tiene las características (a), (b) y (c) y opcionalmente (D) de la reivindicación 1.

3. Un método para almacenamiento de una enzima proteasa aspártica para coagulación de leche, en el que el método comprende las siguientes etapas:

40 (a): proporcionar una composición de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2;

y

(b): almacenar la composición durante un periodo de 90 días a 2000 días a una temperatura de -10 °C a 50 °C.

45 4. Un método para la fabricación de un alimento o producto alimentario que comprende la adición de una cantidad eficaz de una composición de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 al alimento o ingrediente(s) alimentario(s) y llevar a cabo etapas de fabricación adicionales para obtener el alimento o producto alimentario, y

50 en la que el producto es un producto a base de leche y en la que el método comprende la adición de una cantidad eficaz de la composición de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 a la leche y llevar a cabo etapas de fabricación adicionales para obtener el producto a base de leche; y

55 en la que la leche es leche de oveja, leche de cabra, leche de búfalo, leche de yak, leche de llama, leche de camello o leche de vaca; y

en la que el producto a base de leche es un producto de leche fermentada, un queso fresco batido o un queso.

60 5. El método de la reivindicación 4, en el que una composición de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche primero se ha almacenado de acuerdo con el método para almacenamiento de una enzima proteasa aspártica para coagulación de leche de la reivindicación 3 y a partir de ese momento se añade al alimento o ingrediente(s) alimentario(s) de acuerdo con la reivindicación 4.

65 6. Un proceso para aislar una enzima proteasa aspártica para coagulación de leche de interés a partir de un medio acuoso que comprende tal enzima de interés, en el que el método comprende las etapas de:

- (i): obtener una muestra acuosa que consiste en un número de componentes incluyendo la proteasa aspártica;
(ii): añadir polímero en una concentración de 1 ppm a 5000 ppm a la muestra acuosa de la etapa (i) para obtener una muestra que contiene polímero; y
(iii): aislar la proteasa aspártica de la muestra que contiene polímero de la etapa (ii) y de ese modo obtener la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche aislada de interés;
en el que el polímero es un polímero que tiene las características (a), (b) y (c) y opcionalmente (D) de la reivindicación 1.
7. El proceso de la reivindicación 6, con la condición de que el proceso no sea un proceso, en el que se añaden PEG y sal inorgánica a la muestra acuosa de la etapa (i) con el fin de formar un sistema de dos fases líquida-líquida (acuoso) y a continuación recuperar/aislar la proteasa aspártica de la fase de PEG.
8. El proceso de la reivindicación 6, en el que la etapa de aislamiento (iii) comprende las siguientes etapas:
(A): aplicar el polímero que contiene muestra de la etapa (ii) sobre una fase sólida que comprende una matriz de base sólida que contiene ligandos que comprenden una parte hidrófoba con el fin de obtener adsorción de la proteasa aspártica de interés al ligando; y
(B): eluir la proteasa aspártica de interés de la fase sólida con el fin de recuperar la proteasa aspártica y de ese modo obtener la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche aislada purificada de interés.
9. El proceso de la reivindicación 6, en el que las etapas (i) a (iii) de la reivindicación 6 comprenden:
(i): la muestra acuosa que consiste en un número de componentes incluyendo la proteasa aspártica de la etapa (i) de la reivindicación 6 se aplica sobre una fase sólida que comprende una matriz de base sólida que contiene ligandos que comprenden una parte hidrófoba con el fin de obtener adsorción de la proteasa aspártica de interés al ligando;
(ii): la adición del polímero en la etapa (ii) de la reivindicación 6 es adición al tampón de elución; y
(iii): la etapa de aislamiento (iii) de la reivindicación 6 comprende eluir la proteasa aspártica de interés de la fase sólida con el fin de recuperar la proteasa aspártica y de ese modo obtener la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche aislada purificada de interés.
10. La composición de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 o el proceso para aislar una enzima proteasa aspártica para coagulación de leche de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9,
en la que la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche es quimosina de *Camelius dromedarius* que comprende la secuencia de aminoácidos del polipéptido que se muestra en la Figura 5 en el presente documento (denominada "Quimosina_camello") o una variante de quimosina de *Camelius dromedarius*, en la que la variante comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90 % (preferiblemente al menos un 95 %, más preferiblemente al menos un 99 %) con la secuencia de aminoácidos del polipéptido de quimosina de camello que se muestra en la Figura 5 en el presente documento; o
en la que la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche es pepsina bovina que comprende la secuencia de aminoácidos del polipéptido que se muestra en la Figura 5 en el presente documento (denominada "Pepsina_bovina") o una variante de pepsina bovina, en la que la variante comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90 % (preferiblemente al menos un 95 %, más preferiblemente al menos un 99 %) con la secuencia de aminoácidos del polipéptido de pepsina bovina que se muestra en la Figura 5 en el presente documento.
11. La composición de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 o la reivindicación 10 o el proceso para aislar una enzima proteasa aspártica para coagulación de leche de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en los que el polímero es Polietilenglicol (PEG) Polivinilpolipirrolidona, Alcohol polivinílico, Acetato de polivinilo, Poliacrilonitrilo, Poliacrilato, Polimetacrilato, polisorbato o Brij 35.
12. La composición de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche de la reivindicación 11 o el proceso para aislar una enzima proteasa aspártica para coagulación de leche de la reivindicación 11, en los que el polímero es Polietilenglicol (PEG), polisorbato 20 o Brij 35 y en los que PEG tiene una masa molecular de 5000 g/mol a 15000 g/mol.
13. La composición de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 o cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12,
en la que la fuerza enzimática en el apartado (i) es una fuerza de 100 IMCU/g de la composición a 10000 IMCU/g de la composición; y
en la que la concentración del polímero en el apartado (ii) está en una concentración de 100 ppm a 3000 ppm (p/p);
y
en la que la sal se selecciona entre el grupo de NaCl, KCl, Na₂SO₄, (NH₄)₂SO₄, K₂HPO₄, KH₂PO₄, Na₂HPO₄ o

NaH₂PO₄ o una combinación de los mismos; y

- en la que la actividad específica de la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche es superior a 300 IMCU/mg de proteína enzima proteasa aspártica para coagulación de leche total, en la que la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche es quimosina de *Camelius dromedarius* que comprende la secuencia de aminoácidos del polipéptido que se muestra en la Figura 5 en el presente documento (denominada "Quimosina_camello") o una variante de quimosina de *Camelius dromedarius*, en la que la variante comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90 % (preferiblemente al menos un 95 %, más preferiblemente al menos un 99 %) con la secuencia de aminoácidos del polipéptido de quimosina de camello que se muestra en la Figura 5 en el presente documento; o

- en la que la actividad específica de la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche es superior a 150 IMCU/mg de proteína enzima proteasa aspártica para coagulación de leche total, en la que la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche es quimosina bovina que comprende la secuencia de aminoácidos del polipéptido que se muestra en la Figura 5 en el presente documento (denominada "Quimosina_bovina") o una variante de quimosina bovina, en la que la variante comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90 % (preferiblemente al menos un 95 %, más preferiblemente al menos un 99 %) con la secuencia de aminoácidos del polipéptido de quimosina bovina que se muestra en la Figura 5 en el presente documento; y

en la que si la composición es una composición líquida entonces la composición líquida tiene un peso total de 10 g a 10000 kg; y

en la que si la composición es una composición granulada seca entonces la composición granulada seca tiene un peso total de 0,5 g a 50 kg.

14. El proceso para aislar una enzima proteasa aspártica para coagulación de leche de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12,

en el que el polímero se añade en la etapa (ii) en una concentración de polímero de 100 ppm a 4000 ppm (p/p); y

en el que la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche aislada obtenida en la etapa (iii) tiene una pureza de al menos un 60 % en p/p de proteína total (es decir, un 60 % en p/p de proteína total en la composición aislada es la enzima proteasa aspártica coagulante aislada); y

en el que el polímero es Polietilenglicol (PEG) Polivinilpolipirrolidona, Alcohol polivinílico, Acetato de polivinilo, Poliacrilonitrilo, Poliacrilato, Polimetacrilato o Brij 35; y

en el que cuando el polímero es Polietilenglicol (PEG), Polivinilpolipirrolidona, Alcohol polivinílico, Acetato de polivinilo, Poliacrilonitrilo, Poliacrilato o Polimetacrilato - el polímero es un polímero con una masa molecular de 2000 g/mol a 30000 g/mol; y

en el que la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche aislada en la etapa (iii) es una enzima que:

- tiene una actividad específica de la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche superior a 300 IMCU/mg de proteína enzima proteasa aspártica para coagulación de leche total, más preferiblemente la actividad específica de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche es superior a 350 IMCU/mg de proteína enzima proteasa aspártica para coagulación de leche total, en la que la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche es quimosina de *Camelius dromedarius* que comprende la secuencia de aminoácidos del polipéptido que se muestra en la Figura 5 en el presente documento (denominada "Quimosina_camello") o una variante de quimosina de *Camelius dromedarius*, en la que la variante comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90 % (preferiblemente al menos un 95 %, más preferiblemente al menos un 99 %) con la secuencia de aminoácidos del polipéptido de quimosina de camello que se muestra en la Figura 5 en el presente documento; o

- tiene una actividad específica de la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche superior a 150 IMCU/mg de proteína enzima proteasa aspártica para coagulación de leche total, más preferiblemente la actividad específica de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche es superior a 165 IMCU/mg de proteína enzima proteasa aspártica para coagulación de leche total, en la que la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche es quimosina bovina que comprende la secuencia de aminoácidos del polipéptido que se muestra en la Figura 5 en el presente documento (denominada "Quimosina_bovina") o una variante de quimosina bovina, en la que la variante comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90 % (preferiblemente al menos un 95 %, más preferiblemente al menos un 99 %) con la secuencia de aminoácidos del polipéptido de quimosina bovina que se muestra en la Figura 5 en el presente documento; y

en el que la muestra acuosa que consiste en un número de componentes incluyendo la proteasa aspártica de la etapa (i) se obtiene mediante producción recombinante de la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche en una célula hospedadora de producción (por ejemplo, una célula hospedadora de producción eucariota tal como

célula de *Aspergillus*); y

en el que el proceso para aislar una enzima proteasa aspártica para coagulación de leche de interés se realiza mediante el uso de al menos una técnica de purificación seleccionada entre el grupo que consiste en: cromatografía, cromatografía en columna, adsorción en lecho, adsorción en lecho expandido (EBA), adsorción discontinua, adsorción sobre membrana y cromatografía de intercambio iónico (IEC).

15. El proceso para aislar una enzima proteasa aspártica para coagulación de leche de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 o la reivindicación 14,

en el que el polímero se añade en la etapa (ii) en una concentración de polímero de 100 ppm a 4000 ppm (p/p); y

en el que la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche aislada obtenida en la etapa (iii) tiene una pureza de al menos un 60 % en p/p de proteína total (es decir, un 60 % en p/p de proteína total en la composición aislada es la enzima proteasa aspártica coagulante aislada); y

en el que el polímero es Polietilenglicol (PEG) con una masa molecular de 5000 g/mol a 15000 g/mol o Brij 35; y

en el que la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche aislada en la etapa (iii) es una enzima que:

- tiene una actividad específica de la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche superior a 300 IMCU/mg de proteína enzima proteasa aspártica para coagulación de leche total, más preferiblemente la actividad específica de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche es superior a 350 IMCU/mg de proteína enzima proteasa aspártica para coagulación de leche total, en la que la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche es quimosina de *Camelius dromedarius* que comprende la secuencia de aminoácidos del polipéptido que se muestra en la Figura 5 en el presente documento (denominada "Quimosina_camello") o una variante de quimosina de *Camelius dromedarius*, en la que la variante comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90 % (preferiblemente al menos un 95 %, más preferiblemente al menos un 99 %) con la secuencia de aminoácidos del polipéptido de quimosina de camello que se muestra en la Figura 5 en el presente documento; o

- tiene una actividad específica de la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche superior a 150 IMCU/mg de proteína enzima proteasa aspártica para coagulación de leche total, más preferiblemente la actividad específica de enzima proteasa aspártica para coagulación de leche es superior a 165 IMCU/mg de proteína enzima proteasa aspártica para coagulación de leche total, en la que la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche es quimosina bovina que comprende la secuencia de aminoácidos del polipéptido que se muestra en la Figura 5 en el presente documento (denominada "Quimosina_bovina") o una variante de quimosina bovina, en la que la variante comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90 % (preferiblemente al menos un 95 %, más preferiblemente al menos un 99 %) con la secuencia de aminoácidos del polipéptido de quimosina bovina que se muestra en la Figura 5 en el presente documento; y

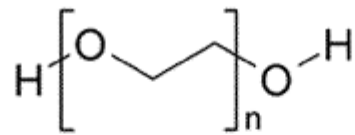
en el que la muestra acuosa que consiste en un número de componentes incluyendo la proteasa aspártica de la etapa (i) se obtiene mediante producción recombinante de la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche en una célula hospedadora de producción (por ejemplo, una célula hospedadora de producción eucariota tal como célula de *Aspergillus*); y

en el que el proceso para aislar una enzima proteasa aspártica para coagulación de leche de interés se realiza mediante el uso de al menos una técnica de purificación seleccionada entre el grupo que consiste en: cromatografía, cromatografía en columna, adsorción en lecho, adsorción en lecho expandido (EBA), adsorción discontinua, adsorción sobre membrana y cromatografía de intercambio iónico (IEC); y

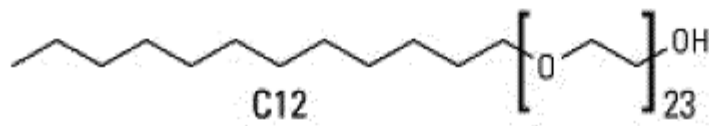
en el que la parte hidrófoba del ligando es un grupo bencilo; y

en el que la enzima proteasa aspártica para coagulación de leche es quimosina de *Camelius dromedarius* que comprende la secuencia de aminoácidos del polipéptido que se muestra en la Figura 5 en el presente documento (denominada "Quimosina_camello") o una variante de quimosina de *Camelius dromedarius*, en el que la variante comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90 % (preferiblemente al menos un 95 %, más preferiblemente al menos un 99 %) con la secuencia de aminoácidos del polipéptido de quimosina de camello que se muestra en la Figura 5 en el presente documento; o en la que enzima proteasa aspártica para coagulación de leche es pepsina bovina que comprende la secuencia de aminoácidos del polipéptido que se muestra en la Figura 5 en el presente documento (denominada "Pepsina_bovina") o una variante de pepsina bovina, en la que la variante comprende una secuencia de polipéptidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90 % (preferiblemente al menos un 95 %, más preferiblemente al menos un 99 %) con la secuencia de aminoácidos del polipéptido de pepsina bovina que se muestra en la Figura 5 en el presente documento.

Figura 1



PEG



Detergente Brij* 35
PM 1225

Figura 2A : Quimosina de camello

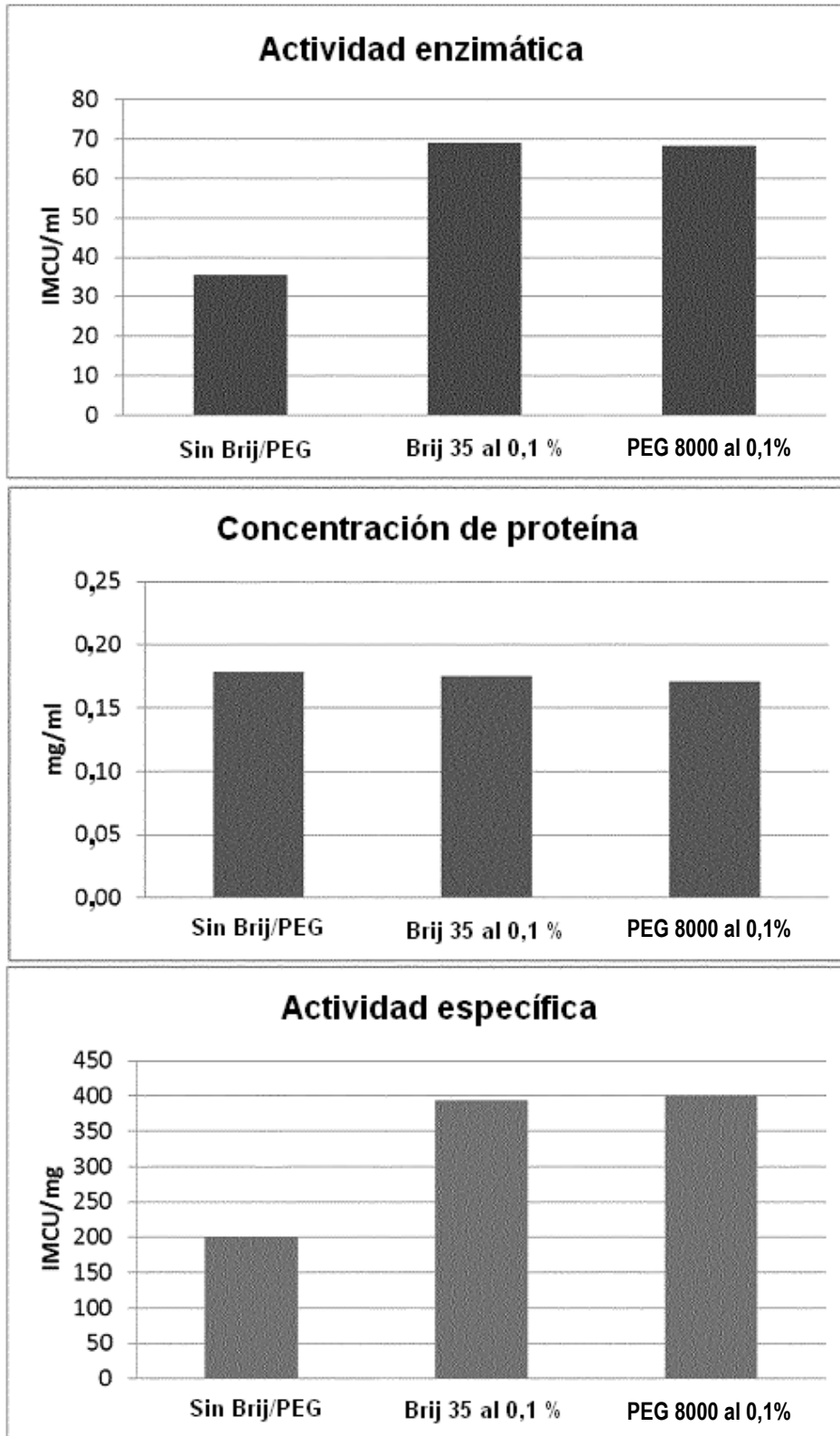


Figura 2B: Quimosina bovina

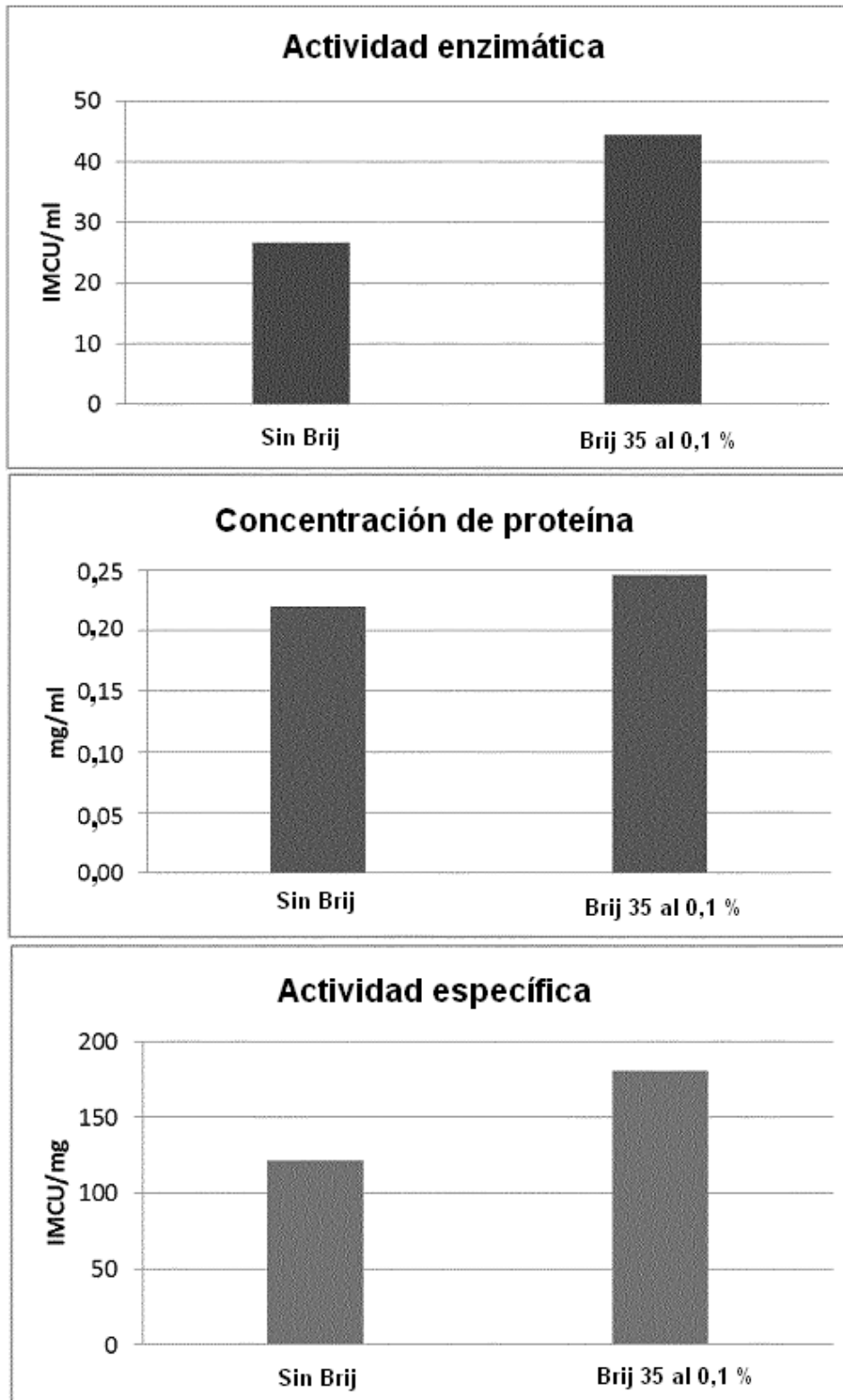


Figura 3

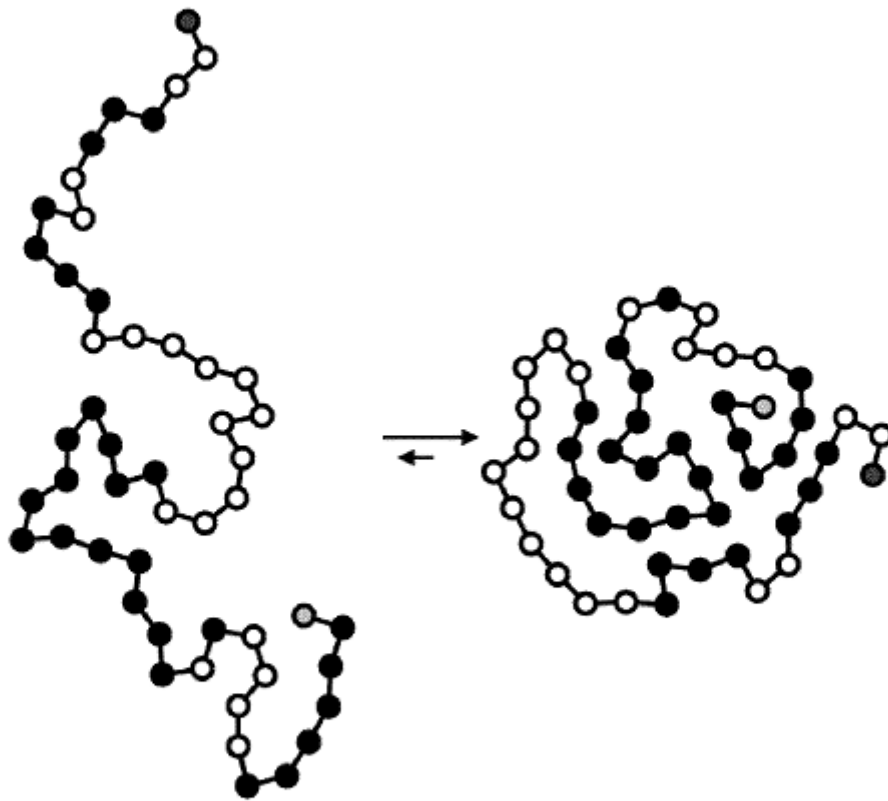


Figura 5

```

Quimosina_camello      ----GKVAREPLTSYLDSQYFGKIYIGTPPQEFTVVFDTGSSDLWVPSIYCK-SNVCKNH
Quimosina_vaca       ----GEVASVPLTHYLDSQYFGKIYIGTPPQEFTVLFDTGSSDFWVPSIYCK-SNACKNH
Pepsina_vaca        --AATLVSEQPLQNYLDTEYFGTIIGTTPAQDFTVIFDTGSSNLWVPSIYCS-SEACTNH
Mucor                AAADGSDVTPGYDFDLEEYAI PVSIGTPGQDFLLLFDTGSSDTPWPHKGCTKSEGCVGS
Endothia           ---STGSATTPIDSLDDAYITPVQIGTPAQLNLDFDTGSSDLWVFSSETT-ASEVDGQ
                        .      *      : : *** * : : *****: **      . : . .

Quimosina_camello      HRFDPKRSSTFRNLG-KPLSIHYGTG-SMEGFLGYDVTVTSNI VDPNQTVGLSTEQPGEV
Quimosina_vaca       QRFDPRKSSTFQNLG-KPLSIHYGTG-SMQGILGYDVTVTSNI VDIQQTVGLSTQEPGDV
Pepsina_vaca        NRENPQDSSTYEATS-ETLSITYGTG-SMTGILGYDVTQVGGISDTNQIFGLSETEPGSF
Mucor                RFFDPSASSTFKATN-YLNINITYGTG-GANGLYFEDSIAIGDITVTKQILAYVDNVRGPT
Endothia           TIYTPSKSTTAKLLSGATWSISYGDGSSSSGDVYTDTVSVGGTLVTGQAVESAKKVSSSF
                        : *  *:* . . . * ** * . *  * : : : : * . .

Quimosina_camello      FTYSE-----FDGILGLAYPS---LASEY---SVPVFDNMMDRHLVARDLFSVYMDRNGQ
Quimosina_vaca       FTYAE-----FDGILGMAYPS---LASEY---SIPVFDNMMNRHLVAQDLFSVYMDRNGQ
Pepsina_vaca        LYYAP-----FDGILGLAYPS---ISSSG---ATPVFDNIWDQGLVSDLFVYLSNEE
Mucor                AEQSPNADIFLDGLFGAAYPDNTAMEAEYGSTYNTVHVNLKQGLISSPLFSVYMNNSG
Endothia           TEDST-----IDGLLGLAFST---LNTVSPTQQKTFFDNAKAS--LDSPVFTADLGYHAP
                        :      : ** : * * : . : : :      . . . *      : : * : . : . :

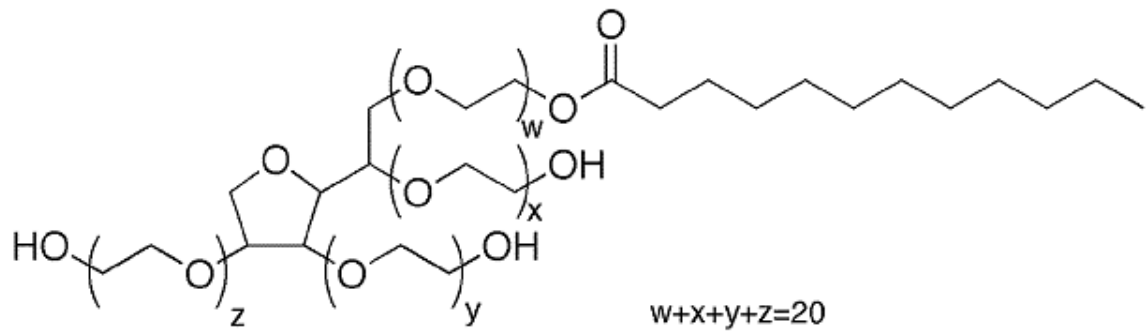
Quimosina_camello      -GSMLTLGAIDPSYTTGSLHWVPVTLQQ----YWQFTVDSVTING-VAVACVGGCQAILD
Quimosina_vaca       -ESMLTLGAIDPSYTTGSLHWVPVTVQQ----YWQFTVDSVTISG-VVVACEGGCQAILD
Pepsina_vaca        SGSVVVIFGDI DSSYSGSLNHWVPVSVVEG----YWQITVDSITMNG-ESIACSDGCQAIVD
Mucor                -TGEVVFVGGVNTLLGGDIAYTDVMSRYGGYFWDAFVTGITVDGSAAVRFSRPQAFITD
Endothia           --GTYNFGFIDTTAYTGSITYTAVSTRQG---FWENTSTGYAVGS--GTFKSTSIDGIAD
                        .  * : : : * : : . * .      * : . . . : : . . *

Quimosina_camello      TGTSVLFPGPSSDILKIQAIG--ATENRYGEFDVINCGLNLSMPTVVFEINGRDYPLSPSA
Quimosina_vaca       TGTSKLVGPSSDILNIQAIG--ATQNYGEFDIDCDNLSYMPVTVVFEINGKMYPLTPSA
Pepsina_vaca        TGTSLLAGPTTAISNIQSYIG--ASEDSSGEVVISCSSIDSLPDI VFTINGVQYVPVPPSA
Mucor                TGTNFFIMPSSAASKIVKAALPDATETQQGWVPCASYQNSKSTISIVMQKSGSSSDTIE
Endothia           TGTLLLYLPATVVSAYWAQVSGAKSSSSVGGYVFPSC--ATLPSFTFGVGSARIVIPGDY
                        ***. : * : :      . : . *      . . . . : :

Quimosina_camello      YTS-KDQGFCTSGFQ-----GDNSELWILGDVFI REYYSVFD RANN-RVGLAKAI
Quimosina_vaca       YTS-QDQGFCTSGFQ-----SENHSQKWILGDVFI REYYSVFD RANN-LVGLAKAI
Pepsina_vaca        YIL-QSNGICSSGFEG----MDISTSSGDLWILGDVFI RQYFTVFD RGNH-QIGLAPVA
Mucor                ISV-PVSKMLLPVDQSNETCMFII LPDGGNQYIVGNLFLRFFVIVYDFGNN-RIGFAPLA
Endothia           IDFGPISTGSSSCFGG-----IQSSAGIGINIFGDVALKA AFVFN GATTPTLGFASK-
                        .      .      * . * : : : * : : . . . * : *

Quimosina_camello      -----
Quimosina_vaca       -----
Pepsina_vaca        -----
Mucor                SAYENE
Endothia           -----
    
```

Figura 6



Polisorbato 20