

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 707 384**

51 Int. Cl.:

C07K 14/00 (2006.01)
A23C 9/12 (2006.01)
C12N 9/50 (2006.01)
C12N 9/62 (2006.01)
C12N 15/57 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.06.2003 PCT/DK2003/00398**
87 Fecha y número de publicación internacional: **24.12.2003 WO03106484**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2003 E 03759881 (0)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2018 EP 1515986**

54 Título: **Método mejorado de producción de una proteasa aspártica en un organismo huésped recombinante**

30 Prioridad:

17.06.2002 DK 200200922

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.04.2019

73 Titular/es:

**CHR. HANSEN A/S (100.0%)
Bøge Allé 10-12, P.O. Box 407
2970 Hørsholm, DK**

72 Inventor/es:

**VAN DEN BRINK, JOHANNES MAARTEN;
HARBOE, MARIANNE K.;
PETERSEN, STEEN GULDAGER y
RAHBEK-NIELSEN, HENRIK**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 707 384 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

Método mejorado de producción de una proteasa aspártica en un organismo huésped recombinante

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere generalmente al campo de polipéptidos y en particular a proteasas aspárticas tales como por ejemplo quimosina. Específicamente, la invención está relacionada con medios recombinantes novedosos de mejorar la producción y/o secreción de polipéptidos, en particular proteasa aspártica, que se modifica en al menos un sitio de glicosilación.

Técnica anterior y antecedentes técnicos

10 Existe una amplia variedad de huéspedes procariotas y eucariotas y está disponible para la expresión de genes heterólogos. Las características de importancia para seleccionar un huésped apropiado dependen de la característica de la proteína a producir y las aplicaciones de la misma. Parece que los hongos filamentosos poseen características únicas, que los hacen atractivos como organismos huésped para la producción de productos de gen heterólogo. Un experto sabe además que ciertas especies fúngicas pueden secretar grandes cantidades de proteínas en cultivos sumergidos. En 1991, cepas seleccionadas de *Aspergillus niger* pueden producir más de 20 g de glucoamilasa por litro en fermentaciones industriales. Durante la última década, se ha explorado ampliamente el uso de hongos filamentosos para la expresión y secreción de proteínas heterólogas. Por ejemplo, Berka *et al.* (1991) dieron a conocer el uso de cepas de *Aspergillus niger* var. *awamori* como huéspedes para la expresión y secreción de quimosina bovina y aspartil proteasa de *Rhizomucor miehei* (RmAP), dos enzimas de coagulación de la leche usadas comercialmente en fabricación de quesos para conseguir coagulación (también conocido como cuajadura) de la leche.

20 La coagulación enzimática de leche por enzimas de coagulación de la leche, tales como quimosina y pepsina, es obviamente uno de los procesos más importantes en la fabricación de quesos. La coagulación de la leche enzimática es un proceso de dos fases: una primera fase donde una enzima proteolítica, preferiblemente una proteasa aspártica tal como por ejemplo quimosina o pepsina, ataca a κ -caseína, dando como resultado un estado metaestable de estructura micelar de caseína y una segunda fase, donde a continuación se coagula la leche y forma un coágulo.

25 La quimosina (EC 3.4.23.4) y pepsina (EC 3.4.23.1), las enzimas de coagulación de la leche del estómago de mamíferos, son proteasas aspárticas que se producen de manera natural en las células de la mucosa gástrica de varias especies de mamíferos incluyendo especies de rumiantes, especies porcinas, especies de primates y especies de ungulados. Cuando se presenta en las células de la mucosa gástrica, se produce quimosina como preproquimosina enzimáticamente inactiva. Cuando se excreta quimosina, un fragmento peptídico N-terminal, el prefragmento (péptido señal) se escinde para dar proquimosina incluyendo un profragmento. Proquimosina es una forma sustancialmente inactiva de la enzima que, sin embargo, se activa en condiciones ácidas a la quimosina activa mediante eliminación autocatalítica del profragmento. La forma activa se denomina la forma madura. Esta activación se produce *in vivo* en la luz gástrica en condiciones de pH apropiadas o *in vitro* en condiciones ácidas.

35 Con frecuencia se produce una disponibilidad insuficiente de estómagos de ternero y una consecuencia de esto es que el precio de la quimosina de ternero está sujeta a fluctuaciones indeseables. Por estas razones, la expresión de quimosina bovina en microorganismos es muy atractiva como método de producción, ya que tenderá a impedir fluctuaciones de niveles de precio y hasta la fecha se han expresado con éxito secuencias de ADNc de quimosina bovina en bacterias, levaduras y hongos filamentosos.

40 Sin embargo, desafortunadamente existen barreras importantes para alcanzar mayores rendimientos de proteasas aspárticas tales como por ejemplo quimosina de hongos filamentosos. Ejemplos de las mismas incluyen degradación proteolítica de la proteína por aspartil proteasas de huésped endógenas y secreción ineficaz del producto de proteína heteróloga a partir de hongos.

45 Con el fin de evitar algunas de las barreras anteriores, la práctica general de producción de proteínas no homólogas en hongos es realizar una fusión de la proteína de interés a una molécula transportadora fúngica altamente secretada tal como por ejemplo glucoamilasas, o amilasas o celulasas. Se introduce habitualmente un sitio de escisión específico entre la molécula transportadora y la proteína no fúngica. Un ejemplo de un sistema de producción de este tipo es la producción de quimosina por *Aspergillus niger* var. *awamori*, en el que el gen de proquimosina se fusiona al transportador fúngico glucoamilasa (Ward *et al.*, 1990).

50 La molécula de quimosina está bien caracterizada en la técnica anterior. Parece que la quimosina consiste en una cadena sencilla de 223 aminoácidos que tiene tres puentes disulfuro y un peso molecular de aproximadamente 35.000. Se conoce la secuencia de aminoácidos. La quimosina existe en al menos dos isoformas, a saber A y B. La forma A posee el aminoácido Asp en la posición 244, mientras que la forma B tiene en su lugar una Gly en la misma posición.

55 La quimosina se caracteriza además por tener dos sitios de glicosilación N-X-S que sin embargo están escasamente

glicosilados. Se muestra que el grado de glicosilación es menos del 1%, cuando se produce quimosina en un animal bovino frente a un grado de aproximadamente el 10% cuando se produce por fermentación de un *Aspergillus niger* var. *awamori* modificado por ingeniería genética.

5 Todas las proteasas aspárticas consisten en dos dominios similares empaquetados de tal manera que se forma una hendidura de sitio activo profunda. Parece que el aminoácido Asp (n.ºs 34 y 216, refiriéndose a quimosina) son los aminoácidos principales que participan en la catálisis, pero también Tyr75, situada en un bucle, el denominado *flap*, parecen influir en la actividad enzimática (Gilliland *et al.*, 1990)

10 En la técnica anterior hay opiniones conflictivas de si la glicosilación de proteínas heterólogas mejora o no la secreción de la proteína del huésped. Aunque la mayoría de la técnica anterior parece vincular una secreción mejorada con una glicosilación de la proteína (Berka *et al.*, 1991), algunos autores declaran que la glicosilación de proteínas puede no ser un prerrequisito para obtener una producción de glicoproteínas y/o secreción potenciada del huésped (Wallis *et al.* 1999).

15 Según la actual técnica anterior, la glicosilación básica implica la unión de oligosacáridos a residuos de Asn (Jenkins y Curling, 1994), Ser y Thr en la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr en la superficie de las moléculas. Los oligosacáridos unidos a residuos de Asn se denominan de unión a N, mientras que aquellos unidos a Ser y Thr se designan como oligosacáridos de unión a O. Los glicanos de unión a N, que en general se entienden como monosacáridos unidos juntos mediante enlaces glicosídicos, tienen en el presente contexto una región central de dos residuos de *N*-acetilglucosamina, que proporcionan el enlace a la proteína, unido con ocho residuos de manosa. A partir de un documento de revisión secreción de proteínas (Peberdy, 1994), parece que la glicosilación de unión a O de una proteína es esencial para la secreción, mientras que los oligosacáridos de unión a N parece que son importantes cuando se proporciona la proteína con estabilidad y resistencia a la influencia del entorno.

20 Parece que Thr en la posición 3 en la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr conduce a una oportunidad aumentada de glicosilación en comparación con Ser en esta posición (Jenkins y Curling, 1994). Además, varios otros factores pueden ser importantes para la glicosilación, es decir la posición (susceptibilidad) de la Asn en la estructura tridimensional y diferentes organismos de producción glicosilan de manera diferente (Harboe, 1998).

25 Parece a partir de la técnica anterior que se ha sugerido mejorar la secreción de proteínas heterólogas producidas en hongos filamentosos mediante una introducción de sitios de glicosilación. A modo de ejemplo Berka *et al.* (1991) demuestran en un estudio que se modificó la región codificante de quimosina mediante introducción de un sitio de glicosilación N-X-S de unión a N consenso (Ser⁷⁴ → Asn⁷⁴, His⁷⁶ → Ser⁷⁶) en una molécula de quimosina que tenía una glicosilación muy baja de los dos posibles sitios de glicosilación en quimosina y sin pareja de fusión. Se descubrió que se aumentaron los rendimientos de producción de quimosina extracelular al menos tres veces en comparación con la quimosina nativa parental que tenía sólo dos sitios escasamente glicosilados. Sin embargo, pareció además que la actividad específica de la denominada glicoquimosina se redujo a aproximadamente el 20% en relación con la quimosina nativa. Es evidente a partir del texto que el trabajo experimental se realizó a escala de laboratorio y que el resultado fue rendimientos de quimosina muy bajos. Una conclusión de este trabajo es que se mejoró el rendimiento a partir de un bajo rendimiento hacia un rendimiento todavía bajo de quimosina secretada.

30 Ya que además la actividad específica cayó significativamente, debe concluirse que las sustituciones no conservativas realizadas por Berka, deben ser acordes con otros efectos sobre la actividad y propiedades enzimáticas.

40 Hasta la fecha, no se ha usado ni descrito públicamente la glicosilación mejorada para obtener niveles comerciales de producción de proteínas, supuestamente porque se ha observado y establecido como un hecho indiscutible que la producción de enzimas aumentada debido a glicosilación estaba acompañada de actividad enzimática específica gravemente disminuida, no haciéndolo un método de producción atractivo.

45 El documento US5800849A se refiere al uso de proteasa de *Rhizomucor* producida de manera recombinante para elaborar queso.

El documento WO0202597A2 se refiere a polipéptidos glicosilados que comprenden sitios de glicosilación añadidos especiales.

50 Hasta ahora parece, a partir de la técnica anterior, que no se ha descrito un método en el que se aumente la capacidad de producción de la actividad enzimática en este contexto mediante alteración de la glicosilación de proteasa aspártica tal como, por ejemplo, quimosina sin influir en las propiedades enzimáticas.

Sumario de la invención

El problema a resolver por la presente invención es proporcionar un método para conseguir rendimientos de producción aumentados de una proteasa aspártica producida de manera recombinante, tal como por ejemplo quimosina, sin influir sustancialmente en las propiedades enzimáticas de proteasa aspártica como tal.

55 La solución se basa en que los presentes inventores han identificado que se ha descubierto que la capacidad de

producción recombinante de una proteasa aspártica, tal como por ejemplo quimosina, puede aumentarse mediante una alteración de un sitio de glicosilación específico. Más específicamente, incorporando un nuevo sitio de glicosilación N-X-T dentro de un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de proteasa aspártica. En el ejemplo 1 en el presente documento se incorpora un nuevo sitio de glicosilación N-X-T en la parte madura activa de una proteasa aspártica y en el ejemplo 3 se incorpora un nuevo sitio de glicosilación N-X-T en una secuencia de ligador situada en el sentido de 5' de un profragmento de una proteasa aspártica. La figura 1 ilustra esquemáticamente estos ejemplos. En ambos casos, el resultado fue de rendimientos aumentados de la proteasa aspártica producida de manera recombinante sin reducir significativamente la actividad de la enzima en comparación con su homóloga nativa.

5 Sin estar limitada a la teoría, se cree que el hecho de que se haya incorporado el sitio de glicosilación N-X-T en sitios muy diferentes, tanto dentro como fuera de la parte madura de proteasa aspártica respalda que los presentes inventores hayan identificado un nuevo concepto general. En otras palabras el sitio de glicosilación N-X-T puede incorporarse en numerosos sitios diferentes y todavía dar los rendimientos aumentados deseados.

10 El polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de proteasa aspártica se codifica por una secuencia de ADN y la secuencia de ADN se ha modificado para tener una secuencia de ADN que codifica para un sitio de glicosilación N-X-T.

Por consiguiente, un primer aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para obtener una secuencia de polinucleótido aislado según la reivindicación 1.

20 El término "modificar la secuencia de ADN" indica simplemente el trabajo real con el fin de cambiar la secuencia específica del ADN para codificar para un sitio de glicosilación N-X-T de polipéptido extra. Hay numerosos protocolos específicos diferentes para hacerlo y el experto es consciente de elegir el más adecuado para sus necesidades específicas.

25 El término "extra" indica que el sitio de glicosilación N-X-T es nuevo (extra) en comparación con antes de que se modificase la secuencia de ADN. El término "un extra" debe interpretarse como que abarca uno o más sitio(s) de glicosilación extra. El término extra puede también referirse a un sitio de glicosilación modificado.

30 El término "una secuencia de aminoácidos de proteasa aspártica" indica una secuencia que puede ser una proteasa aspártica activa. Puede ser una secuencia de aminoácidos de proteasa aspártica activa madura. Alternativamente, una secuencia de aminoácidos de proteasa aspártica puede ser la secuencia madura más una prosecuencia. Una secuencia de este tipo no es completamente activa enzimáticamente pero puede convertirse en una proteasa aspártica activa mediante eliminación autocatalítica del pro-fragmento (véase anteriormente). De manera similar, una secuencia de aminoácidos de proteasa aspártica puede ser una secuencia que comprende una presecuencia, prosecuencia, y la secuencia madura. Además, dentro del término secuencia de aminoácidos de proteasa aspártica está una secuencia que puede comprender adicionalmente una secuencia de ligador artificial que comprende un sitio de glicosilación N-X-T. La secuencia de ligador artificial es una secuencia no presenta ninguna actividad enzimática en sí misma. La secuencia de ligador artificial debe situarse en relación con una secuencia que se corresponde con un elemento activo de una secuencia de proteasa aspártica. Un elemento activo puede ser una presecuencia, una prosecuencia o una secuencia madura. Un ejemplo de una secuencia de ligador artificial dentro de "una secuencia de aminoácidos de proteasa aspártica" tal como se define en el presente documento se ilustra en la figura 1. Aquí, la secuencia de ligador artificial se sitúa en relación con un prosecuencia. Un sitio de glicosilación N-X-T del ligador artificial debe situarse preferiblemente dentro de 100 aminoácidos (más preferiblemente 60 aminoácidos, incluso más preferiblemente 35 aminoácidos, lo más preferiblemente 15 aminoácidos) del elemento activo más próximo a una secuencia de proteasa aspártica. La secuencia de ligador artificial puede situarse en el extremo N-terminal de la secuencia madura o en el extremo C-terminal de la secuencia madura.

45 El término "una secuencia de polinucleótido aislado" se refiere a una secuencia de ADN clonada según procedimientos de clonación habituales usados en ingeniería genética para trasladar un segmento de ADN de su ubicación natural a un sitio diferente donde se reproducirá. El proceso de clonación implica escisión y aislamiento del segmento de ADN deseado, inserción del trozo de ADN en la molécula vector e incorporación del vector recombinante en una célula donde se replicarán múltiples copias o clones del segmento de ADN. La "secuencia de polinucleótido aislado" de la invención puede denominarse alternativamente "secuencia de polinucleótidos clonada".

La secuencia de polinucleótido aislado del primer aspecto es una secuencia de ADN novedosa.

55 Por consiguiente, un segundo aspecto de la invención se refiere a una secuencia de polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ADN que codifica para un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de proteasa aspártica, obtenible mediante un procedimiento para obtener una secuencia de polinucleótido aislado tal como se describe en el presente documento.

Una ventaja de la incorporación del sitio de glicosilación N-X-T de polipéptido extra es que puede obtenerse un rendimiento aumentado de proteasa aspártica producida de manera recombinante.

Consecuentemente, un tercer aspecto la invención se refiere a un método de producción de un polipéptido que presenta actividad proteasa aspártica que comprende las etapas de cultivar un organismo huésped que comprende una secuencia de polinucleótido aislado del segundo aspecto de la invención y aislar el polipéptido producido que presenta actividad proteasa aspártica.

- 5 El término “que presenta actividad proteasa aspártica” indica una actividad que se corresponde sustancialmente con la actividad de una proteasa aspártica activa madura. Una secuencia de aminoácidos de proteasa aspártica en la que no se escinde la prosequencia no es un polipéptido que presenta actividad proteasa aspártica.

Tal como se dijo anteriormente, una proteasa aspártica, tal como una quimosina comprende dos sitios de glicosilación N-X-S y ningún sitio de glicosilación N-X-T.

- 10 Por consiguiente, un cuarto aspecto la presente invención se refiere a un polipéptido aislado que presenta actividad proteasa aspártica que comprende un sitio de glicosilación N-X-T.

Tal como se define en el presente documento, el término, “un polipéptido aislado” tal como se usa para describir la proteasa aspártica de la invención, es una proteasa aspártica o parte de proteasa aspártica que está exenta sustancialmente de otros polipéptidos no de proteasa aspártica. Preferiblemente, es al menos puro al 5%, preferiblemente al menos puro al 20%, más preferiblemente puro al 50%, incluso más preferiblemente puro al 75%, lo más preferiblemente puro al 90%, e incluso lo más preferiblemente puro al 95%, tal como se determina mediante SDS-PAGE. Además, “un polipéptido aislado” tal como se usa acerca de la proteasa aspártica de la invención, es preferiblemente una proteasa aspártica o parte de proteasa aspártica que está exenta sustancialmente de impurezas homólogas. Una producción recombinante heteróloga de una enzima hace posible realizar una preparación de enzima aislada, caracterizada por estar exenta de impurezas homólogas. Tal como se usa en el presente documento, el término “impurezas homólogas” significa cualquier impureza (por ejemplo otro polipéptido distinto de la enzima de la invención), que se origina a partir de la célula homóloga de la que se obtiene originalmente la enzima de la invención. Si la proteasa aspártica es por ejemplo una quimosina bovina, la célula homóloga puede ser por ejemplo una célula bovina. La producción recombinante heteróloga usando por ejemplo hongos filamentosos como organismo huésped proporcionaría un polipéptido de quimosina bovina aislado exento sustancialmente de impurezas homólogas.

Finalmente, la presente invención se refiere a un polipéptido aislado que presenta actividad proteasa aspártica en el que se ha modificado el polipéptido para comprender un sitio de glicosilación N-X-T extra.

Descripción detallada de la invención

30 La presente invención proporciona en un aspecto un método para alcanzar una cantidad potenciada de proteínas heterólogas secretadas, en particular proteasas aspárticas, de huéspedes eucariotas. Este rendimiento mejorado de proteína secretada se ha logrado sorprendentemente modificando una codificación de polipéptido para una proteasa aspártica modificándose dicho polipéptido que modo que comprenda al menos un sitio de glicosilación N-X-T adicional.

35 En una realización preferida, el polipéptido comprende una proteasa aspártica, que es una quimosina de mamífero. Debe apreciarse que la invención abarca tanto quimosina de mamífero natural o quimosina idéntica a la natural como quimosina de mamífero no natural. En el presente contexto, la expresión “quimosina de mamífero no natural” se refiere a una molécula de quimosina, que no se encuentra normalmente en la naturaleza. Una molécula de quimosina de este tipo puede incluir una molécula de quimosina quimérica, que se codifica y se forma, mediante por ejemplo técnicas de ADN recombinante, a partir de ácidos nucleicos derivados de organismos, que normalmente no intercambian información genética, por ejemplo una especie de rumiante y una especie de *Camelidae*. Además, una quimosina de mamífero no natural también puede incluir una molécula de quimosina codificada por un conglomerado o un intercambio de segmentos de ADN de diferente origen dando como resultado trasposiciones complejas del ADN. Por consiguiente, en una realización adicional de la presente invención, el polipéptido puede comprender una molécula de quimosina de mamífero que se compone de al menos dos moléculas de quimosina diferentes derivadas de especies de mamíferos.

En realizaciones preferidas, el polipéptido comprende una molécula de quimosina de mamífero que se modifica y deriva de una especie de mamíferos seleccionada del grupo que consiste en especies de rumiantes, especies de *Camelidae* incluyendo *Camelus dromedarius*, especies porcinas, especies de *Equidae* y especies de primates. Un animal fuente de especie de rumiante puede seleccionarse de especies bovinas, especies de camello, especies de venado, especies de búfalo, especies de antílope, especies de jirafa, especies ovinas y especies caprinas. Un animal fuente particularmente interesante es *Camelus dromedarius*.

El experto en la técnica apreciará inmediatamente que cualquier polipéptido que comprende preproquimosina, proquimosina o quimosina será útil en la presente invención. Cuando se produce en las células tisulares del estómago, la quimosina se produce como una pre-enzima enzimáticamente inactiva, que se designa como preproquimosina. Cuando se excreta quimosina, se escinde un fragmento N-terminal para dar proquimosina incluyendo un profragmento. La proquimosina es forma esencialmente inactiva de la enzima, que, sin embargo, se activa en condiciones ácidas a la molécula de quimosina activa mediante eliminación del profragmento. Por tanto, en

realizaciones preferidas, el polipéptido comprende una quimosina, que se selecciona del grupo que consiste en preproquimosina, proquimosina y quimosina.

Otra proteasa aspártica adecuada es Pepsina (EC 3.4.23.1). En la fecha de presentación de la presente invención, la base de datos SWISSPROT comprendía las siguientes entradas de secuencias de pepsinas adecuadas:

5 (Número de registro primario, nombre de entrada)

P03954, PEP1_MACFU; P28712, PEP1_RABIT; P27677, PEP2_MACFU; P27821, PEP2_RABIT; P27822, PEP3_RABIT; P27678, PEP4_MACFU; P28713, PEP4_RABIT; P00792, PEPA_BOVIN; Q9N2D4, PEPA_CALJA; P00793, PEPA_CHICK; P00790, PEPA_HUMAN; P11489, PEPA_MACMU; P00791, PEPA_PIG; P81497, PEPA_SUNMU; P13636, PEPA_URSTH; P27823, PEPF_RABIT.

10 Como para quimosina, una pepsina preferida es una pepsina derivada del grupo que consiste en especies de rumiantes. Véase anteriormente para las especies específicas preferidas que se corresponden con las preferidas para quimosina.

15 Una proteasa aspártica adecuada adicional es una proteasa seleccionada del grupo que consiste en Pepsina A (EC 3.4.23.1), pepsina de *Cryphonectria* (EC 3.4.23.22), y pepsina de *Rhizomucor* (EC 3.4.23.23). Como para quimosina, una proteasa preferida de este grupo seleccionado es una proteasa derivada del grupo que consiste en especies de rumiantes.

20 Según la presente invención, la proteasa aspártica glicosilada tiene al menos un sitio de glicosilación N-X-T. Para los fines de esta solicitud, la expresión "sitio de glicosilación N-X-T" se refiere a un sitio de glicosilación en la proteasa aspártica, donde "N" designa al aminoácido asparagina (Asn), "X" cualquier clase de aminoácido y "T" designa al aminoácido treonina (Thr). En una realización preferida, se modifica el polipéptido que modo que comprenda al menos un sitio de N-glicosilación, es decir los oligosacáridos se unen a un residuo de Asn.

25 En el presente contexto, el término "se modifica de modo que comprenda al menos un sitio de glicosilación N-X-T" se ha de interpretar para comprender, en relación al polipéptido parental o nativo a partir del que se deriva el polipéptido según la invención, cualquier modificación de los codones en la secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteasa aspártica que da como resultado al menos un sitio de glicosilación N-X-T adicional. Por tanto, está prescrito en la presente invención insertar o modificar dicho sitio de glicosilación o reconocimiento en la secuencia de la proteasa aspártica parental o nativa. Cualquier modificación de este tipo o cualquier cambio del uso de codones puede basarse en tecnología de ADN recombinante usando por ejemplo dos enfoques. Según un primer enfoque, la alteración del uso de codones está restringida a ciertos tramos de la secuencia codificante (principalmente basada en diseño de PCR y oligonucleótidos) y otro enfoque en el que se optimiza toda la secuencia codificante (principalmente basado en ensamblaje de oligonucleótidos diseñados que representan toda la secuencia codificante). El experto en la técnica apreciará inmediatamente que se conocen en la técnica enfoques adicionales para obtener una modificación de este tipo y pueden usarse tal como está comprendido en la presente invención.

35 Durante la experimentación que conduce al hallazgo altamente inesperado de que una proteasa aspártica, tal como por ejemplo quimosina, que se modifica de modo que comprenda al menos un sitio de glicosilación N-X-T adicional, es decir una variante de proteasa aspártica glicosilada, secretada en rendimientos significativamente mayores de actividad enzimática tal como por ejemplo actividad de coagulación de la leche en relación con una proteasa aspártica sin modificar o parental que tiene el mismo número de sitios de glicosilación en la parte de quimosina y/o un sitio de glicosilación adicional en la región de ligador cuando se expresa en la misma célula huésped y en condiciones esencialmente idénticas. Por tanto, en una realización preferida de la presente invención, el polipéptido es uno en el que se proporciona el al menos un sitio de glicosilación N-X-T modificando uno o más codones en una secuencia de ácido nucleico que codifica para una molécula de quimosina producida de manera natural.

45 En realizaciones convenientes, la secuencia de ácido nucleico que codifica para una molécula de quimosina producida de manera natural se selecciona del grupo que consiste en una secuencia de ácido nucleico silvestre y una secuencia de ácido nucleico que se deriva de una secuencia de ácido nucleico silvestre modificando silenciosamente al menos un codón.

50 Cuando se producen proteasas aspárticas por medios recombinantes, es deseable que las proteínas heterólogas producidas presenten sustancialmente la misma funcionalidad que puede mejorarse preferiblemente en comparación con la proteína parental o nativa a partir de la que es derivable la proteasa aspártica recombinante. Por tanto, es una característica importante de la presente invención que el polipéptido que comprende la proteasa aspártica glicosilada tenga sustancialmente la misma funcionalidad que la proteasa aspártica parental. En el presente contexto, la expresión "sustancialmente la misma funcionalidad" indica que, aunque el polipéptido resultante que comprende la proteasa aspártica difiere de la proteasa aspártica a partir de la que se deriva en uno o más aminoácidos, la variante de proteasa aspártica glicosilada es un análogo funcional de la proteasa aspártica parental a partir de la que se deriva y por tanto posee sustancialmente la misma actividad enzimática o bien antes o bien después de un tratamiento de desglicosilación tal como se comentará a continuación.

55 Por tanto, durante sus experimentos, los inventores de la presente invención descubrieron sitios en la molécula de

proteasa aspártica adecuados para introducir uno o más sitios de glicosilación.

Cuando el presente documento se refiere a “la numeración de quimosina descrita en Gilliland (1990)” se corresponde con la numeración tal como se muestra en SEQ ID NO 1.

5 Las ácido aspártico proteinasas comparten generalmente un plegamiento bilobular que se compone del dominio N-terminal y el C-terminal. Allí, la estructura secundaria consiste principalmente en láminas beta y algunas hélices alfa (Gilliland (1990)). El sitio activo está incrustado entre los dos dominios, en el medio de una hendidura de aprox. 40 Å de ancho, cubierta por un *flap* altamente flexible. Quimosina existe en dos alternativamente formas estructurales, la forma auto-inhibida donde el bolsillo de unión S1 y S3 está ocluido por Tirosina 77 situada en la región *flap* Gustchina E. *et al.*) y la forma activa donde, con el bolsillo de unión, tiene libertad para unirse al sustrato. Las regiones que rodean el sitio activo contienen otros bucles flexibles, es decir para los residuos de aminoácido de quimosina 11-14, 159-163, 241-249, 278-282 y 288-294 (numeración de Gilliland (1990)) que también participan en los cambios conformacionales durante la unión del sustrato. La inserción de sitios NXT en estas regiones puede alterar la dinámica y afectar de ese modo a la actividad y la estabilidad. Estas regiones son regiones preferidas para insertar un sitio NXT. Un ejemplo será la reducción del acceso al sitio activo y haciendo de ese modo que la molécula dependa más de la activación alostérica por la región His-Pro de caseína k.

20 El posicionamiento de sitios de glicosilación NXT en la superficie de proteasa de ácido aspártico será de interés en muchos aspectos. La distribución de carga de superficie de quimosina, que proporciona una pequeña extensión positiva en residuos de aminoácido 48-62 y un bucle de carga negativamente en los residuos de aminoácido 241-249 que se propone que contribuyen a la estabilización electrostática del complejo enzima-sustrato. Es probable que la glicosilación en estas regiones ponga restricciones adicionales a la actividad de las enzimas. En general, la glicosilación situada en áreas cargadas afectaría a interacciones electrostáticas intermoleculares cercanas.

25 La quimosina tiene una naturaleza extremadamente hidrófoba. En general es más difícil la producción de proteínas hidrófobas. Una manera de mejorar los niveles de producción de quimosina es reducir su hidrofobicidad, por ejemplo reemplazando algunos aminoácidos hidrófobos por un sitio de glicosilación. Ya que los grupos de glicosilación son cadenas laterales voluminosas, es importante colocar un grupo de este tipo fuera de las regiones importantes para la actividad enzimática o para la unión del sustrato, caseína.

Preferiblemente, se reemplazan los tres aminoácidos hidrófobos de posición 203-205 (VVV) por un sitio N-X-T, preferiblemente un sitio N-T-T.

30 El apantallamiento de pequeñas extensiones hidrófobas, es decir el enlace disulfuro expuesto en superficie de quimosina de Cys₂₅₀-Cys₂₈₃ mediante glicosilación por inserción proporcionará el comportamiento molecular alterado, por ejemplo, con respecto a la estabilidad y la solubilidad. También hay sitios preferidos para insertar un sitio de glicosilación NXT.

35 Tal como se muestra en los ejemplos a continuación, los inventores descubrieron que el rendimiento de la proteasa aspártica producida de manera heteróloga era especialmente eficaz cuando se modificaba un sitio de glicosilación en una posición específica de la proteasa aspártica tal como, por ejemplo, una molécula de quimosina. En una realización preferida, el polipéptido es uno en el que se introduce el al menos un sitio de glicosilación N-X-T en las posiciones 291-293 de la molécula de quimosina parental o nativa según la numeración de quimosina descrita en Gilliland (1990). En una realización adicional, el polipéptido es uno en el que la secuencia de ácido nucleico que codifica para la quimosina producida de manera natural se modifica sustituyendo S₂₉₃ con T creando un sitio de glicosilación NXT.

Según la presente invención, el polipéptido parental que comprende una proteasa aspártica puede ser cualquier polipéptido que pueda demostrar ser útil en unas aplicaciones generalizadas, tales como por ejemplo en la industria alimentaria o médica.

45 La expresión “polipéptido parental que comprende una proteasa aspártica” en el presente contexto, incluirá cualquier polipéptido que codifica para una proteasa aspártica, tal como proteasa aspártica silvestre o una variante de la misma, que son sustancialmente funcional y/o estructural, idénticas a la proteasa aspártica codificada por el polipéptido.

50 Se conoce generalmente en la técnica que la expresión de un producto génico en forma de una proteína de fusión puede potenciar la expresión y secreción de un producto génico heterólogo. En este contexto, el término “proteína de fusión” indica una proteína quimérica que comprende como una parte una secuencia de aminoácidos de proteasa aspártica tal como por ejemplo proquimosina, quimosina, ligador artificial-proquimosina, o quimosina o al menos una parte activa de coagulación de la leche de la misma, y como segunda parte una pareja de fusión. El término “secuencia de aminoácidos de proteasa aspártica” se describe anteriormente y el término pareja de fusión se debe entender en este contexto como cualquier polipéptido al que se fusiona la secuencia de aminoácidos de proteasa aspártica. Por consiguiente, en una realización de la invención, el producto génico comprende una proteína de fusión. Parejas de fusión convenientes pueden ser un transportador fúngico secretado tal como uno seleccionado del grupo que consiste en glucoamilasa, alfa-amilasa, celobiohidrolasa y una parte o fragmento de los mismos. En una realización específica, el polipéptido comprende una proteína de fusión, que consiste en glucoamilasa y

proquimosina. La figura 1 ilustra esquemáticamente una proteína de fusión que comprende glucoamilasa como pareja de fusión. La pareja de fusión puede situarse en el extremo N-terminal de la secuencia madura o en el extremo C-terminal de la secuencia madura.

5 El término "secuencia de aminoácidos de proteasa aspártica" preferiblemente no incluye la secuencia de la pareja de fusión.

10 Los inventores de la presente invención descubrieron rendimientos aumentados de producción cuando se produce una proteasa aspártica similar a la natural, en ciertas circunstancias a saber mediante introducción de una secuencia de ligador artificial entre la secuencia de nucleótidos que codifica para la molécula transportadora por ejemplo glucoamilasa, y usando la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteasa aspártica de interés. Un ejemplo de un ligador de este tipo se muestra en los ejemplos a continuación, donde dicho ligador contiene un sitio de glicosilación N-X-T adicional. En este sentido, se descubrió que la proteasa aspártica de fusión está mucho más glicosilada y por tanto se producirá y secretará a niveles mayores por el huésped en relación con una proteasa aspártica producida sin un ligador entre la secuencia de nucleótidos que codifica para la pareja de fusión y la proteasa aspártica. Además, la proteasa aspártica de fusión es totalmente idéntica a la proteasa aspártica natural. La proteasa aspártica de interés se libera específicamente de la pareja de fusión mediante una escisión determinada, que tiene lugar durante la secreción o mientras se encuentra en el medio de cultivo. Esta escisión específica debe producirse en el extremo C-terminal de la secuencia de ligador para obtener una proteasa aspártica idéntica a la natural. Por consiguiente, en una realización conveniente, el polipéptido comprende una proteasa aspártica de fusión donde se separan glucoamilasa y proteasa aspártica por un ligador artificial, dicho ligador comprende preferiblemente un sitio de glicosilación tal como un sitio de glicosilación N-X-T.

20 Tal como se ha mencionado anteriormente, la presente invención es particularmente adecuada para la aportación de una mejora de la glicosilación de proteínas producidas de manera heteróloga o de sus parejas de fusión, tales como por ejemplo proteasas aspárticas con el fin de aumentar la producción de dicha proteasa aspártica. En realizaciones preferidas, el polipéptido que comprende una proteasa aspártica según la invención es, cuando se expresa en un hongo filamentoso, al menos glicosilada al 10%, tal como al menos al 20%, por ejemplo al menos al 30% incluyendo al menos al 40% tal como al menos al 50%, por ejemplo al menos al 60% incluyendo al menos al 70%, tal como al menos al 80%, por ejemplo al menos al 90% o incluso glicosilada al 100% en relación con el polipéptido que comprende una proteasa aspártica que no está modificada de modo que comprenda al menos un sitio de glicosilación N-X-T. En realizaciones adicionales, el polipéptido que comprende una proteasa aspártica según la invención es, cuando se expresa en *Aspergillus niger* var. *awamori*, al menos glicosilada al 10%, tal como al menos al 20%, por ejemplo al menos al 30% incluyendo al menos al 40% tal como al menos al 50%, por ejemplo al menos al 60% incluyendo al menos al 70%, tal como al menos al 80%, por ejemplo al menos al 90% o incluso glicosilada al 100% en relación con el polipéptido que comprende una proteasa aspártica que no está modificada de modo que comprenda al menos un sitio de glicosilación N-X-T.

35 Se conoce generalmente en la técnica que la glicosilación de polipéptidos, cuando estos son heterólogos expresados por un huésped eucariota, puede tener una actividad enzimática reducida en comparación con el polipéptido natural pertinente. Se ha descubierto (Berka *et al.* 1991) que la actividad enzimática de proteasas aspárticas de origen microbiano que se glicosilan tras expresión puede potenciarse sometiendo a las proteasas a un tratamiento desglicosilante que elimina al menos parcialmente los restos de azúcares unidos a las proteasas. Un tratamiento de desglicosilación de este tipo puede comprender por ejemplo tratar la proteasa glicosilada con una enzima que tiene actividad desglicosilante. Ejemplos de enzimas que tienen una actividad de desglicosilación comprenden PNGasa y endo-p-N-acetilglucosaminidasa (EC 3.2.1.96) (Endo-H). Alternativamente, la desglicosilación puede lograrse sometiendo a las proteasas glicosiladas a un tratamiento químico, tal como por ejemplo tratamiento con perydato.

40 En una realización específica, el polipéptido que comprende una proteasa aspártica tiene una actividad de coagulación de la leche de la que se aumenta, en relación con el polipéptido glicosilado, en al menos el 20%, por ejemplo al menos el 30% incluyendo al menos el 40% tal como al menos el 50%, por ejemplo al menos el 60% incluyendo al menos el 70%, tal como al menos el 80% cuando se le somete a un tratamiento de desglicosilación.

50 Mediante la presente invención se contempla además que puede obtenerse desglicosilación de una proteasa aspártica expresada de más de una manera directa proporcionando una célula huésped que además de proteasa aspártica también expresa una enzima desglicosilante tal como por ejemplo Endo-H, que implica que la proteasa aspártica inicialmente glicosilada se desglicosila o bien intracelularmente o bien tras secreción.

55 Tal como se mencionó anteriormente, un objetivo principal de la presente invención es proporcionar un método para mejorar la producción y/o secreción de proteasas aspárticas en organismos huésped incluyendo hongos filamentosos. Por consiguiente, en un aspecto adicional se proporciona un método de producción de un polipéptido aislado que presenta actividad proteasa aspártica que comprende las etapas de cultivar un organismo huésped que comprende una secuencia de polinucleótido aislado del segundo aspecto de la invención y aislar el polipéptido producido que presenta actividad proteasa aspártica.

En una etapa inicial de este método, se proporciona una secuencia de ácido nucleico, es decir un polinucleótido que

codifica para una proteasa aspártica incluyendo preproquimosina, proquimosina o quimosina modificada tal como se definió anteriormente. El experto en la técnica apreciará que pueden usarse varios enfoques para proporcionar una secuencia parental para una secuencia modificada de este tipo incluyendo uno basado en el aislamiento de ARNm de células de mucosas de la especie animal fuente seleccionada y usando este ARN como molde en un procedimiento de amplificación de nucleótido tal como una reacción PCR usando cebadores adecuados sentido y antisentido que por ejemplo pueden construirse sintéticamente basados en secuencias conocidas para especies seleccionadas. El experto en la técnica apreciará que pueden usarse otros métodos para obtener una secuencia codificante parental que puede modificarse según la invención, tales como procedimientos de hibridación usando como sondas fragmentos de secuencia codificantes conocidas para la proteasa aspártica que permitirá detectar la presencia de ADN o ARN homólogo en preparaciones de células de las especies fuente seleccionadas. Alternativamente, es posible construir una secuencia codificante parental basada en el aislamiento de la proteasa aspártica incluyendo preproquimosina, proquimosina o quimosina seguido de determinar la secuencia de aminoácidos de la enzima o fragmentos de la misma que permite a su vez la construcción de oligonucleótidos cebadores para la detección y la obtención de secuencias codificantes. Las técnicas básicas que se requieren en los procedimientos anteriores de obtención de secuencias codificantes están generalmente dentro del conocimiento común del experto en la técnica (Sambrook *et al.*, 1989).

Habiendo aislado o construido la secuencia parental que codifica para la proteasa aspártica incluyendo preproquimosina, proquimosina o quimosina y posteriormente modificado dicha secuencia codificante de modo que comprenda al menos un sitio de glicosilación N-X-T tal como se definió anteriormente, puede construirse un vector de expresión que comprende la secuencia codificante según la invención y, conectado de manera operante a ello, señales de expresión apropiadas, es decir secuencias para controlar o regular la expresión, permitiendo que la proteasa aspártica se exprese en un célula huésped seleccionada. Un vector de expresión adecuado puede comprender una o más señales de expresión tales como secuencias de promotor, operadores, sitios de unión al ribosoma, sitios de inicio de la traducción y/o secuencias que codifican para sustancias represoras o activadoras. Para permitir la secreción del polipéptido expresado, puede insertarse una secuencia de señales en el sentido de 5' de la secuencia codificante para la proteasa aspártica o puede fusionarse el polipéptido expresado a un polipéptido endógeno secretado de manera natural. En el presente contexto, el término "señal de expresión" incluye cualquiera de las secuencias de control anteriores, sustancias represoras o activadoras y secuencias de señal. Para la expresión bajo la dirección de secuencias de control, la secuencia codificante está conectada de manera operante a las secuencias de control de manera apropiada con respecto a la expresión.

Según la invención, un vector de expresión que porta la secuencia codificante o polipéptido que codifica para la proteasa aspártica tal como se definió anteriormente puede ser cualquier vector que pueda expresar la secuencia codificante en el organismo huésped seleccionado, y la elección del tipo de vector dependerá de la célula huésped en la que se introduce. Por tanto, el vector puede ser un vector replicante de manera autónoma, es decir un vector que existe como entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica en las células huésped, por ejemplo un plásmido, un vector viral, un minicromosoma o un cromosoma artificial. Alternativamente, el vector puede ser un vector que, cuando se introduce en una célula huésped, se integra en el genoma de célula huésped y se replica con el cromosoma, incluyendo un elemento que se puede trasponer.

En el vector, el polipéptido que codifica para la proteasa aspártica está combinado de manera operante con una secuencia de promotor adecuada. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN, que confiere actividad transcripcional al organismo huésped de elección y puede derivarse de genes que codifica para proteínas, que son o bien homólogos o heterólogos con respecto al organismo huésped.

Para la transcripción en una especie fúngica, ejemplos de promotores convenientes son aquellos derivados de los genes que codifican para la alcohol oxidasa de *Pichia pastoris*, amilasa TAKA de *Aspergillus oryzae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, α -amilasa neutra de *Aspergillus niger*, α -amilasa estable al ácido de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *A. niger*, lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, trifosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae* o acetamidasa de *Aspergillus nidulans* y un promotor chbl de *Trichoderma reesei*. Como ejemplos de promotores adecuados para la expresión en una especie de levadura pueden mencionarse los promotores Gal 1 y Gal 10 de *Saccharomyces cerevisiae*.

El vector que comprende el fragmento de ADN que codifica para el polipéptido de proteasa aspártica puede comprender también un marcador seleccionable, por ejemplo un gen cuyo producto complementa un defecto en el organismo huésped tal como una mutación que confiere un fenotipo auxotrófico, o el marcador puede ser uno que confiera resistencia a antibióticos o resistencia iones de metales pesados.

En una realización específica, el vector de expresión se deriva de pGAMpR tal como se describe en Ward *et al.*, 1990 sustituyendo la secuencia codificante de ese vector por proquimosina bovina con una secuencia codificante para la proteasa aspártica tal como se definió anteriormente. Un ejemplo de un vector de expresión derivado de pGAMpR de este tipo es pGAMpR-C depositado en un entorno de huésped de *Aspergillus niger* var. *awamori* con los n.ºs de registro CBS 108915 y CBS 108916, respectivamente.

En una etapa posterior del método, se transforma una célula huésped adecuada con el vector de expresión. La célula huésped puede transformarse con un vector replicante de manera autónoma o un vector que permite que el

polipéptido se integre en el cromosoma de célula huésped. Dicha integración se considera generalmente ventajosa ya que es más probable que el polipéptido se mantenga de manera estable en la célula. La integración del polipéptido en el cromosoma del huésped puede llevarse a cabo según métodos convencionales tales como por ejemplo mediante recombinación homóloga o heteróloga o por medio de un elemento que se puede trasponer.

- 5 Según la invención, el organismo huésped puede ser una célula de un organismo superior tal como una célula animal, incluyendo una célula de mamífero, de ave o de insecto, o una célula vegetal. En realizaciones convenientes el organismo huésped puede ser una especie de levadura o una especie de hongo filamentoso.

Un organismo huésped de levadura adecuado puede seleccionarse ventajosamente de una especie de *Saccharomyces* incluyendo *Saccharomyces cerevisiae* o una especie perteneciente a *Schizosaccharomyces*.
10 Organismos huésped de levadura convenientes adicionales incluyen *Pichia* spp. tal como especies metilotróficas de la misma, incluyendo *Pichia pastoris*, y *Kluyveromyces* spp. incluyendo *Kluyveromyces lactis*.

En una realización preferida, la célula huésped es una célula de hongo filamentoso. "Hongos filamentosos" incluye todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycota y Oomycota (tal como se definió en Hawksworth *et al.*, 1995, véase anteriormente). Los hongos filamentosos se caracterizan por un micelio vegetativo que se compone de quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano y otros polisacáridos complejos. El desarrollo vegetativo es mediante elongación de hifa y el catabolismo de carbono es obligatoriamente aerobio. En cambio, desarrollo vegetativo por levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* mediante brote de un tallo unicelular y el catabolismo de carbono puede ser fermentativo. En una realización más preferida, célula huésped de hongo filamentoso es una célula de una especie de, pero no limitada a, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mucor*, *Myceliophthora*,
15 *Neurospora*, *Penicillium*, *Thielavia*, *Tolyposcladium*, y *Trichoderma* o un teleomorfo o sinónimo de los mismos. En una realización incluso más preferida, la célula huésped de hongo filamentoso es una célula de *Aspergillus*. En otra realización aún más preferida, la célula huésped de hongo filamentoso es una célula de *Acremonium*. En otra realización incluso más preferida, la célula huésped de hongo filamentoso es una célula de *Fusarium*. En otra realización incluso más preferida, la célula huésped de hongo filamentoso es una célula de *Humicola*. En otra
20 realización incluso más preferida, la célula huésped de hongo filamentoso es una célula de *Mucor*. En otra realización incluso más preferida, la célula huésped de hongo filamentoso es una célula de *Myceliophthora*. En otra realización incluso más preferida, la célula huésped de hongo filamentoso es una célula de *Neurospora*. En otra realización incluso más preferida, la célula huésped de hongo filamentoso es una célula de *Penicillium*. En otra realización incluso más preferida, la célula huésped de hongo filamentoso es una célula de *Thielavia*. En otra
25 realización incluso más preferida, la célula huésped de hongo filamentoso es una célula de *Tolyposcladium*. En otra realización incluso más preferida, la célula huésped de hongo filamentoso es una célula de *Trichoderma*. En una realización la más preferida, la célula huésped de hongo filamentoso es una célula de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger* (incluyendo *Aspergillus nigar var. awamori*) o *Aspergillus oryzae*. En otra realización más preferida, la célula huésped de hongo filamentoso es una
30 célula de *Fusarium* de la sección Discolor (también conocida como la sección *Fusarium*). En otra realización preferida, la célula parental de hongo filamentoso es una célula de cepa de *Fusarium* de la sección *Elegans*, por ejemplo, *Fusarium oxysporum*. En otra realización más preferida, la célula huésped de hongo filamentoso es una célula de *Humicola insolens* o *Thermomyces lanuginosa*. En otra realización más preferida, la célula huésped de hongo filamentoso es una célula de *Rhizomucor miehei*. En otra realización más preferida, la célula huésped de
35 hongo filamentoso es una célula de *Myceliophthora thermophilum*. En otra realización más preferida, la célula huésped de hongo filamentoso es una célula de *Neurospora crassa*. En otra realización más preferida, la célula huésped de hongo filamentoso es una célula de *Penicillium purpurogenum*. En otra realización más preferida, la célula huésped de hongo filamentoso es una célula de *Thielavia terrestris*. En otra realización más preferida, la célula de *Trichoderma* es una célula de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma koningii*,
40 *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*.

Alguno de los organismos huésped convenientes anteriores, tales como especies fúngicas, pueden transformarse mediante un procedimiento que implica formación de protoplastos y transformación de los protoplastos seguida de regeneración de la pared celular de una manera conocida por el experto.

En etapas subsiguientes, la célula huésped transformada se cultiva en condiciones donde el polipéptido se expresa, y la proteasa aspártica se recoge. El medio usado para cultivar las células huésped transformadas puede ser cualquier medio convencional adecuado para el crecimiento de las células huésped en cuestión y obtener expresión del polipéptido. Están disponibles medios adecuados de proveedores comerciales o pueden prepararse según recetas publicadas.
50

La proteasa aspártica resultante se recupera normalmente del medio de cultivo mediante procedimientos convencionales incluyendo separar las células huésped del medio por centrifugación o filtración, si es necesario, después de alteración de las células, seguido de precipitación de los componentes proteínicos del sobrenadante o filtrado por ejemplo añadiendo una sal tal como sulfato de amonio, seguido de una etapa de purificación. Alternativamente, el medio de cultivo exento de células también puede usarse, opcionalmente después de concentrarlo o diluirlo o adición de aditivos convencionales, directamente como un producto coagulante para la
55 fabricación de queso.
60

Según la invención, el método anterior es preferiblemente un método en el que el rendimiento de proteasa aspártica es de al menos el 2%, el 5%, el 10%, el 25%, el 50%, el 100% ó el 200% mayor que el rendimiento de un polipéptido no modificado que comprende una proteasa aspártica obtenida cuando, en condiciones de producción idénticas, se usa el mismo huésped. Tal como se mencionó anteriormente, la proteasa aspártica es preferiblemente una quimosina de mamífero, tal como proquimosina, proquimosina o quimosina.

En una realización adicional preferida, el método es uno en el que el rendimiento de actividad de coagulación de la leche de quimosina en términos de unidades arbitrarias de medio de cultivo se aumenta en al menos el 25% en relación con el rendimiento obtenido usando, en condiciones de cultivo idénticas, una cepa de producción que es idéntica a la del organismo huésped transformado excepto que expresa un polipéptido que comprende una molécula de quimosina de mamífero que no se ha modificado para comprender al menos un sitio de glicosilación N-X-T. Sin embargo, el rendimiento de actividad de coagulación de la leche de quimosina en términos de unidades arbitrarias de medio de cultivo se aumenta en al menos el 50%, tal como al menos el 75% incluyendo al menos el 100%.

En un aspecto aún adicional se proporciona una composición de coagulación de la leche que comprende el polipéptido que comprende una proteasa aspártica que incluye una quimosina de mamífero tal como se define en el presente documento y una pepsina y se produce mediante el método anterior incluyendo una proquimosina o quimosina de este tipo que está en una forma sustancialmente desglicosilada. Una composición de este tipo puede comprender, además de la enzima de coagulación de la leche activa, aditivos que se usan de manera convencional en cuajos de origen animal tal como por ejemplo NaCl.

La composición de coagulación de la leche recombinante tal como se proporciona en el presente documento es útil como un producto coagulante de leche. Por consiguiente, un objetivo importante de la invención es proporcionar un método para fabricar queso, que comprende añadir una cantidad eficaz de coagulante de leche de la composición anterior a la leche y llevar a cabo etapas de fabricación de queso apropiadas adicionales. El polipéptido que comprende una quimosina de mamífero de la invención es apropiado para procedimientos de fabricación de queso en los que la leche se selecciona de leche de vaca, leche de camello, leche de búfalo, leche de cabra y leche de oveja.

En realizaciones convenientes, la composición de coagulante de leche que contiene el polipéptido comprende por un lado una quimosina de mamífero tal como se definió anteriormente y por otro lado al menos una enzima de coagulación de la leche adicional. Las al menos dos enzimas de coagulación de la leche incluidas en dicha composición tendrán también en realizaciones convenientes de la invención una razón de actividad de coagulación de la leche, que está dentro del intervalo de desde 1:99 a 99:1, además de estar caracterizadas por el descubrimiento de que al menos el 2% de su actividad de coagulación de la leche se origina a partir de la quimosina de mamífero tal como se definió anteriormente tal como por ejemplo al menos el 5%, el 10%, el 20%, el 50%, el 75, 90 ó el 98% de la actividad.

En una realización preferida, la composición según la invención puede retener al menos el 50% de su actividad de coagulación de la leche inicial a una temperatura de -20°C o mayor durante 1 semana o más. Sin embargo, es en realizaciones adicionales preferidas que la composición retiene al menos el 60% de su actividad metabólica inicial, por ejemplo al menos el 70% incluyendo al menos el 80% tal como al menos el 90% de su actividad metabólica inicial.

También se proporciona un método de fabricar queso a partir de leche, incluyendo leche de vaca, que comprende añadir una cantidad eficaz de coagulante de leche del polipéptido tal como se define en el presente documento o de la composición anterior y llevar a cabo las etapas apropiadas adicionales de fabricación de queso.

Tal como se describió anteriormente, se cree que los presentes inventores han identificado un concepto novedoso para mejorar la producción de proteasa aspártica. Sin estar limitado a la teoría, se cree que el concepto dado a conocer podría usarse también en otras enzimas. Por consiguiente, el término "proteasa aspártica" tal como se describe en el presente documento en relación con aspectos y realizaciones preferidas de la invención puede ser cualquier enzima en general. Enzimas preferidas son una lipasa, una amilasa, una fosfolipasa, una proteasa subtilisina o una celulasa.

Ahora la invención se explicará con más detalle en los siguientes ejemplos y los dibujos, en los que

la figura 1A es una ilustración de manera esquemática de una proteína de fusión que comprende una pareja de fusión y una secuencia de aminoácidos de proteasa aspártica. La secuencia de aminoácidos de proteasa aspártica comprende un ligador artificial.

La figura 2 muestra la secuencia de nucleótidos de modB-XS (fragmento de Sall/XbaI modificado) con varios sitios de restricción únicos. Véase el ejemplo 1.

La figura 3: fragmentos de ADN sintético descritos adicionalmente en el ejemplo 1.

55 Ejemplos

EJEMPLO 1

Construcción de un plásmido novedoso que codifica para la quimosina B bovina con un sitio de glicosilación optimizado

1.1 Introducción

5 En un método usado actualmente de producción de quimosina bovina de manera recombinante en una cepa huésped de *Aspergillus*, se produce quimosina B como una proteína de fusión entre glucoamilasa y proquimosina B de *Aspergillus* (Ward *et al.* 1990). Con este fin se fusionaron las secuencias génicas que codifican para la glucoamilasa y proquimosina B de *Aspergillus*.

10 En este ejemplo se reemplaza la secuencia génica de proquimosina B por un nuevo gen de quimosina B sintético que comprende un sitio de N-glicosilación optimizado. El nuevo gen se denominó quimosina modBM. Con el fin de construir el gen de quimosina modBM se diseñó un gen sintético que codificaba para el gen de quimosina modBM. Se diseñó como control un gen sintético que codificaba para el gen de quimosina B nativo. Ambos genes sintéticos tuvieron un uso de codones optimizado para la expresión en *Aspergillus* y se expresaron como proteínas de fusión con glucoamilasa.

15 1.2. Materiales y métodos

1.2.1 Construcción de un gen que codifica para la quimosina B modificado

20 Se diseñó un fragmento de ADN sintético de 1138 pb y se designó como modB-XS (figura 2). El fragmento modB-XS comprende un sitio *Sall* y *XhoI* único para fines de clonación. Este fragmento comprende la información para la proquimosina B. La parte que codifica para proquimosina B de modB-XS se designa como quimosina modB. Se diseñó un segundo fragmento sintético y se designó como modBM-XS. ModBM-XS es idéntico a modB-XS, excepto por la introducción de un sitio de glicosilación adicional (S293T, que da como resultado un sitio de glicosilación N-H-T).

1.2.2 Construcción de plásmidos que codifican para la quimosina B bovina

25 Se produjeron cinco fragmentos de ADN sintéticos, usando oligonucleótidos sintéticos. El procedimiento de combinar oligonucleótidos en un fragmento de ADN mayor mediante apareamiento lo conoce bien el experto en la técnica.

Los cinco fragmentos obtenidos fueron (véase la figura 3):

- (i) un fragmento de *Sall-SphI I* de 410 pb (SEQ ID XXX-1)
- (ii) un fragmento de *SphI-BsrGI* de 220 pb (SEQ ID XXX-2)
- (iii) un fragmento de *BsrGI-KpnI* de 190 pb (SEQ ID XXX-3)
- 30 (iv) un fragmento de *KpnI-XbaI* de 320 pb (SEQ ID XXX-4)

Para la construcción del gen de modBM se diseñó un fragmento de *KpnI-XbaI* modificado (SEQ ID XXX-5).

Se clonaron todos los subfragmentos en el vector pCRII-TOPO (Invitrogen) según las instrucciones suministradas por el fabricante.

35 Para combinar los subfragmentos, se creó un vector con un poliligador optimizado (*Sall-SphI-BsrGI-KpnIXbaI*). Para este fin se diseñó un poliligador sintético (SEQ ID XXX-6) y se clonó en el vector pCRII-TOPO. Más tarde se insertó el fragmento de poliligador en los sitios *BssHI* del plásmido pBluescript SK II, dando como resultado pSK-MCS.

Se aislaron los subfragmentos anteriores de los vectores pCRII-Topo y se clonaron secuencialmente en pSK-MCS. Se designaron los vectores finales, respectivamente, como pSKMCS-Sal-Xba-B (quimosina B) y pSKMCS-Sal-Xba-BM (quimosina BM).

40 Se aisló el casete de expresión de pGAMpR (Ward *et al.* 1990) como un fragmento de *SpeI-XbaI*. Se deletionó el sitio *Sall* de pBluescript SKII+, dando como resultado pSK-Sal-. Se clonó el casete de expresión en los sitios *SpeI-XbaI* de pSK-Sal-, dando como resultado el plásmido pSK-Sal-GlaChy. Se usaron los fragmentos de *Sall-XbaI* de pSKMCS-Sal-Xba-B y pSKMCS-Sal-Xba-BM, respectivamente, para reemplazar el fragmento de *Sall-XbaI* en pSK-Sal-GlaChy, dando como resultado los plásmidos pSKModChymB y pSKModChymBM, respectivamente.

45 Se usaron los fragmentos de *SpeI-XbaI* de los constructos de pSKModChym para reemplazar los fragmentos de *SpeI-XbaI* en pGAMpR, dando como resultado pGAMmodB y pGAMmodBM, respectivamente. Por tanto, los constructos de pGAMmodB y pGAMmodBM comprenden un gen que codifica para la quimosina nativa y una quimosina modificada (S293T), respectivamente.

EJEMPLO 2

Producción de quimosina usando una cepa de *Aspergillus niger* var. *awamori* transformada con pGAMmodBM

2.1 Introducción

5 Para investigar el efecto de una glicosilación mejorada sobre la producción de quimosinas en hongos, se transformó *Aspergillus* con el nuevo plásmido de expresión pGAMmodBM. Como control, se generaron transformantes también con pGAMmodB.

2.2 Transformación de la cepa de *Aspergillus niger* var. *awamori* con pGAMmodBM y pGAMmodB

10 Se usó como receptor un derivado de *Aspergillus niger* var. *awamori*, cepa GCI-HF1-2dgr246. La cepa GCI-HF1-2dgr246 comprende varias copias del plásmido pGAMpR. Se produjo una cepa derivada, dgr246pyrG (Ward et al. 1990) curando todas las copias de pGAMpR mediante selección de un fenotipo *pyrG*, haciendo que la cepa fuese incapaz de crecer en ausencia de uridina.

Se depositó la cepa dgr246pyrG según el tratado de Budapest ante el *Centraalbureau voor Schimmelcultures* (CBS, Oficina Central de Cultivos de Hongos), Oosterstraat 1, apartado de correos 273, 3740 AG Baarn, Países Bajos, el 13 de junio de 2000 con el n.º de registro CBS 108914.

2.2.1. Propagación de biomasa fúngica

15 Se añadieron 50 ml de medio CSL [por litro: licor de maíz macerado, 100 g; NaH₂PO₄·2H₂O, 1 g; MgSO₄, 0,5 g; agente antiespumante Mazu, 2 g, maltosa, 100 g, glucosa, 10 g, fructosa, 50 g, agua, 736,5 g] a un matraz estéril de 250 ml, se le añadieron 0,5 ml de complemento de penicilina/estreptomicina (Gibco-BRL n.º 15140-114)] y se inoculó el medio con 10⁶ esporas por ml. Se cultivó el medio inoculado durante la noche a 34-37°C a 200-250 rpm para obtener una suspensión densa de micelio. Se transfirieron 10 ml de este precultivo a 100 ml de un medio de *Aspergillus* completo en un matraz de 500 ml sin deflectores y se incubó durante la noche a una temperatura de 34-37°C a 200-250 rpm para obtener una biomasa miceliar.

2.2.2. Generación de protoplastos

25 Se filtró el micelio tal como se obtuvo en la etapa anterior sobre Myracloth estéril, se lavó con agua estéril y se lavó posteriormente con NaCl/CaCl₂ 1700 mOsmol (CaCl₂·2 H₂O 0,27 M, 39,7 g/l; NaCl 0,58 M, 33,9 g/l), se escurrió con cuidado hasta sequedad y se transfirió a un tubo Falcon para determinar el peso y se mantuvo en hielo.

Se añadieron 20 ml de NaCl/CaCl₂ 1700 mOsmol por g de micelio con el fin de resuspender el micelio seguido de la adición de 50 mg de enzima lítica de *Trichoderma harzianum* Sigma L-1412 por g de micelio disuelto en un pequeño volumen de NaCl/CaCl₂ 1700 mOsmol, y se incubó en un matraz Erlenmeyer a 100 rpm, 37°C durante aproximadamente 4 h, periodo durante el cual se resuspendió el micelio repetidamente cada 30 minutos.

30 Después de obtenerse protoplastos de forma exhaustiva, es decir producirse muchos protoplastos libres y sin quedar apenas ningún micelio intacto, se filtró la mezcla en hielo, usando hoja Mesh o Myracloth y se añadió un volumen igual de STC1700 (sorbitol 1,2 M, 218 g/l; NaCl 35 mM, 2,04 g/l; Tris.HCl 10 mM, pH 7,5 y CaCl₂·2 H₂O 50 mM, 7,35 g/l) enfriado con hielo. Se contó el número de protoplastos usando una cámara Bürger-Türk de vidrio. Se centrifugó la suspensión de protoplastos usando una centrífuga de sobremesa a 2.000 rpm a 4°C. Se resuspendió el sedimento resultante con mucho cuidado en 20 ml de STC1700 enfriado con hielo. Se repitió este procedimiento de lavado dos veces y se resuspendió el sedimento final en STC1700 enfriado con hielo hasta una concentración final de aproximadamente 1 x 10⁸ protoplastos por ml seguido de ajuste a 1 x 10⁸ protoplastos por ml.

2.2.3. Transformación

40 Se mezclaron 200 µl de 2x10⁷ de protoplastos, 2 µl de ATA 0,5 M (ácido aurincarboxílico 0,5 M (Sigma) en etanol al 20%) y hasta 15 µl de ADN (que comprendía un marcador), normalmente 5-10 µg de ADN, en un tubo de ensayo de 12 ml. Se uso como control una mezcla correspondiente, pero sin ADN. Se incubaron las mezclas de transformación en hielo durante 25 minutos seguido de la adición de una primer gota de 250 µl de PTC (PEG 4000 al 60%; Tris.HCl 10 mM, pH 7,5; CaCl₂ 50 mM) inclinando el tubo varias veces sin permitir que la mezcla tocara la tapa y posteriormente se añadió una segunda gota de 250 µl de PTC, se mezcló y se añadieron 850 µl seguido de mezclado. Se incubó cada tubo a temperatura ambiente exactamente durante 20 minutos seguido del llenado de los tubos con STC1700 helado y el mezclado de la suspensión dando la vuelta a los tubos. Se centrifugó la mezcla durante 8-10 min usando una centrífuga de sobremesa a 2000 rpm a 4°C. Se disolvió el sedimento resultante con cuidado en aproximadamente 400-800 µl de STC1700.

2.2.4. Regeneración y selección de transformantes

50 Se extendió la mezcla de transformación sobre placas de medio de regeneración selectivo sólido que contenían por litro de medio: agar, 15 g; sorbitol, 218 g; sales de AspA 50x (por litro: 300 g de NaNO₃, 26 g de KCl, 76 g de KH₂PO₄, 18 ml de KOH 10 M, pH de aproximadamente 6,5); glucosa al 50%, 20 ml; pen.-estrep. Gibco-BRL n.º 15140-114, 10 ml; MgSO₄, 2 ml; oligoelementos (2,2 g de ZnSO₄, 1,1 g de H₃BO₃, 0,5 g de MnCl₂·7H₂O, 0,5 g de

FeSO₄·7H₂O, 0,17 g de CoCl₂·6H₂O, 0,16 de CuSO₄·5H₂O, 0,15 de NaMoO₄·2H₂O, 5 g de EDTA, agua hasta 100 ml, pH 6,5), 1 ml. Se incubaron las placas a 37°C durante 5-10 días y se seleccionaron transformantes.

2.3. Producción en matraz de agitación a pequeña escala de quimosina usando *Aspergillus niger* var. *awamori* transformado con pGAMmodBM

- 5 Se seleccionaron 75 de los transformantes anteriores. Se usaron como controles la cepa descrita anteriormente CBS108914, que no produce quimosina, y la cepa de producción de quimosina dgr246clor25 de *Aspergillus niger* var. *awamori* (Dunn-Coleman *et al.* 1991) a la que también se denomina en lo sucesivo PIM1149.

10 Se usaron una cantidad apropiada de los transformantes y las cepas de control para la inoculación de 20 ml de medio CSL [por litro: licor de maíz macerado, 100 g, NaH₂PO₄·2H₂O, 1 g; MgSO₄, 0,5 g; agente antiespumante Mazu, 2 g; maltosa, 100 g; glucosa, 10 g; fructosa, 50 g; agua, 736,5 g]. Tras 24-48 horas de crecimiento a 37°C y 200 rpm, se usaron 2 ml de este precultivo para la inoculación de 20 ml de medio de inducción de *Aspergillus* completo. Se cultivaron las cepas respectivas durante 10 días a 37°C y 200 rpm y se recogieron muestras en el día 6 y el día 8. Se centrifugaron las muestras a 14.000 rpm en una centrifuga Eppendorf y se separó el sobrenadante transparente y se almacenó a -20°C antes de determinar la actividad de coagulación de la leche usando un ensayo
15 convencional.

Los resultados de este estudio se resumen en la tabla 1.

20 Tabla 1: Resume los resultados de los experimentos en matraz de agitación de producción de quimosina con 20 transformantes de pGAMmodBM seleccionados de *Aspergillus niger* var. *awamori* (de 75) usando como control positivo una cepa de *Aspergillus niger* var. *awamori* que porta pGAMpR (PIM1149) y como control negativo un *Aspergillus niger* var. *awamori* curada de plásmidos que codifican para quimosina. Se determinaron unidades de coagulación de la leche arbitrarias (AU) después de 8 días de incubación.

transformante n.º	AU día 8
1 (BM27)	217
2	155
3	100
4	166
5	198
6	179
7	122
8	157
9	169
10	129
11	157
12	116
13	52
14	48
15	138
16	116
17	116
18	100
19	95
20	78
PIM	100
Curado	<2,5

25 Parece que después de 8 días de cultivo, la cepa de control PIM1149 había producido 100 AU. Tres de las cepas transformadas con pGAMmodBM sometidas a prueba produjeron más de 170 AU de las que la cepa con la mayor producción designada como BM27 produjo 217 AU, es decir un rendimiento de actividad de coagulación de la leche más de dos veces mayor que el obtenido con la cepa de control. 6 transformantes adicionales mostraron un nivel de producción de quimosina más del 25% mayor que el de la cepa PIM1149. En total, el 12% de los transformantes sometidos a prueba mostraron niveles de producción de actividad de coagulación de la leche significativamente mayores que los de la cepa de control positivo.

30 Se aumentó la glicosilación relativa en transformantes de producción tanto alta como baja. En fermentaciones de la cepa de control PIM1149, se glicosilaron aproximadamente el 10% de las moléculas de quimosina mientras que en transformantes de pGAMmodBM se glicosilaron más del 90% de las moléculas.

2.4 Fermentación a escala de laboratorio del transformante de pGAMmodBM, BM27

Se llevaron a cabo dos fermentaciones a escala de laboratorio independientes (A y B) con el transformante BM27 y,

5 como control positivo, una cepa de *Aspergillus niger* var. *awamori* que portaba el constructo de pGAMpR usando un fermentador de 2 l. El medio de fermentación usado tenía la siguiente composición: harina de soja Danpro H suministrada por Central Soya, 562,6 g; NH₄SO₄, 2.065,5 g; NaH₂PO₄, 25 g, MgSO₄, 12,5 g; Tween 80, 12,5 g; agente antiespumante Mazu DF, 37,5; agua corriente, 9.625 g; condensado (agua) 2.000 g; disolución de azúcar que consiste en maltosa (Glucidex 47 suministrado por Roquette), 5.000 g y agua corriente, 7.500 g.

Se esterilizó en autoclave la disolución de maltosa por separado a 121°C durante 20 minutos. Se añadieron 3.300 g de la disolución al fermentador después de tratamiento térmico y se bombearon los 9.200 g restantes al fermentador durante el funcionamiento.

10 Las condiciones de fermentación fueron 37°C a pH 5,5. Se inoculó el fermentador con 50 ml de precultivo preparado tal como se describió anteriormente inoculando 100 ml de medio CSL en un matraz de agitación de 500 ml con 1x10⁸ esporas. Se hizo crecer el cultivo durante la noche a 37°C a 200 rpm durante 140 horas. Se recogieron muestras cada 24 horas y se sometieron a ensayo para determinar la actividad de coagulación de la leche de quimosina.

Los resultados se resumen en la tabla 2.

15 Tabla 2: Ilustra los resultados de un experimento de fermentación a escala de laboratorio usando un transformante de pGAMmodBM seleccionado de *Aspergillus niger* var. *awamori*, modBM#27 y como control positivo una cepa de *Aspergillus niger* var. *awamori* que porta pGAMpR (PIM2075). Se determinaron las actividades de coagulación de la leche arbitrarias después de 70, 95, 119 y 140 h de fermentación. Se desechó el cultivo de PIM B después de ± 135 horas.

	70 h	95 h	119 h	140 h
PIM A	71	310	309	308
PIM B	57	228	333	n.d.
BM27 A	58	229	529	687
BM27 B	107	419	572	695

20 Tal como parece, el nivel de actividad de coagulación de la leche producido por el transformante BM27 fue después de 140 horas de fermentación aproximadamente 2 veces mayor que el de la cepa de control PIM2075. También puede observarse que mientras que la cepa de control alcanzó un nivel máximo después de 119 horas, la cepa BM27 continuó produciendo quimosina después de este punto en el tiempo.

25 Se obtuvieron los altos niveles de actividad de coagulación de la leche con la cepa BM27 sin desglucosilación de las muestras. Más del 90% de la quimosina producida por BM27 estaba glicosilada. A partir de estos resultados queda claro que la glicosilación fue un factor importante para una producción eficaz de quimosina por cepas de *Aspergillus*. Con la ubicación del sitio de glicosilación modificado introducido en la posición 291, según la numeración de quimosina (Gilliland, 1990) que podría bloquear la hendidura catalítica de la molécula de quimosina, podría considerarse la posibilidad de que la actividad mejorada de la quimosina BM estuviera provocada parcialmente por una actividad autocatalítica reducida. La glicosilación aumentada observada probablemente mejora la secreción de la enzima y probablemente también da como resultado una estabilidad de proteína mejorada, posiblemente proporcionando la quimosina glicosilada.

EJEMPLO 3

Uso de un ligador glicosilado para aumentar la secreción de proteína por *Aspergillus niger*

35 3.1 Introducción

La práctica general para la producción de proteínas no homólogas en hongos es realizar una fusión de la proteína de interés a una molécula transportadora fúngica altamente secretada tal como glucoamilasas, amilasas, celulasas, etc. Habitualmente se introduce un sitio de escisión específico entre la molécula transportadora y la proteína no fúngica. Un ejemplo de un sistema de producción de este tipo es la producción de quimosina por *Aspergillus niger*. En este caso, el gen de quimosina se fusiona a la glucoamilasa transportadora fúngica.

40 Tal como se muestra en el ejemplo 2, pueden aumentarse mucho los niveles de producción de quimosina por *Aspergillus* introduciendo un sitio de N-glicosilación en la proteína de interés, incluso aunque la molécula transportadora fúngica esté fuertemente glicosilada. Debido a la introducción de un sitio de N-glicosilación adicional, la molécula de proteína resultante diferirá de la molécula nativa en uno o más aminoácidos. Sin embargo, para la aceptación pública de una enzima de este tipo para aplicaciones alimentarias es deseable producir una enzima que sea idéntica a la enzima natural.

45 Para obtener rendimientos de producción aumentados mientras se produce una enzima idéntica a la natural, se diseñó una nueva estrategia. En esta estrategia, se introdujo una secuencia de ligador artificial entre el gen que codifica para la molécula transportadora glucoamilasa y el gen que codifica para la proteína de interés. Se diseñó este ligador para que contuviese un sitio de N-glicosilación adicional, N-X-T, que es el sitio de reconocimiento de N-

glicosilación preferido en eucariotas. De este modo, la proteína de fusión estará glicosilada más fuertemente y, por tanto, se producirá a mayores niveles por el hongo. Se libera la proteína de interés de la proteína transportadora mediante escisión específica durante la secreción o en el medio de cultivo. Esta escisión específica debe producirse en el extremo C-terminal de la secuencia de ligador para obtener una proteína idéntica a la natural.

- 5 Para estudiarlo, se diseñó un nuevo constructo de ADN para la producción de quimosina, denominado pGAMmodB2. Se introdujo una secuencia de ligador, que codifica para los aminoácidos T-D-N-S-T, entre la molécula transportadora glucoamilasa y la quimosina bovina. Durante una denominada etapa de activación (incubación a bajo pH) se produce quimosina madura a partir de proquimosina mediante escisión autocatalítica, dando como resultado la eliminación de la proparte de proquimosina. La quimosina producida por transformantes de pGAMmodB2 usando esta estrategia es completamente idéntica a la quimosina natural. La producción de quimosina en hongos con los plásmidos pGAMpR (fusión directa entre glucoamilasa y quimosina) y pGAMmodB2 se muestra esquemáticamente en la tabla 3.

Tabla 3: muestra la producción de quimosina en matraz de agitación por transformantes de plásmidos pGAMmodB2. Se determinaron unidades de coagulación de la leche arbitrarias después de 8 días de incubación.

transformante	AU	transformante	AU
PIM1	68	39	0
PIM2	67	40	0
curado	0	41	0
1	0	42	59
2	21	43	0
3	0	44	17
4	0	46	0
5	26	47	0
6	36	48	0
7	135	49	0
8	78	50	0
9	0	51	0
10	22	52	0
11	24	53	22
12	0	54	0
13	56	56	0
14	22	58	0
15	0	63	0
16	0	65	44
17	0	67	0
18	0	68	67
19	28	70	21
20	0	78	0
21	0	80	0
22	29	82	0
23	29	83	36
25	0	85	88
26	0	86	47
27	32	87	49
28	24	88	17
29	28	89	0
30	0	90	21
32	0	91	21
33	33	92	85
35	0	93	45
36	0		
37	0		
38	22		

15 3.2 Construcción del plásmido pGAMmodB2

Para la construcción de pGAMmodB2 se eliminó el sitio *Xho*I en el vector pBluescript mediante digestión de pBluescript SKII + (Stratagene) con *Xho*I y *Sal*I y nuevo ligamiento posterior del vector. Se clonó el gen de quimosina a partir del plásmido pGAMmodB (véase el ejemplo 1) en este vector como fragmento de *Spe*I-*Xba*I, dando como resultado pLinker1. Se generó un pequeño fragmento de PCR que contenía la secuencia de ligador usando los oligonucleótidos 8081 (5' CATGTA-CACGCTGAACAGATCCTGAGC) y GlyLin1 (5' CGT CGA CCG CTA CGG TGA CTG ACA CCT GGC GTA CCG ACA ACT CCA CCG AGA TCA CTC GCA TCC CCC TCT ACA AG).

Se clonó el fragmento de PCR resultante en el vector pCR2.1-Topo (Invitrogen) según las instrucciones

suministradas por el fabricante, y se confirmó la secuencia de ADN. Posteriormente, se clonó el fragmento de PCR como fragmento de Sall-XhoI en los sitios correspondientes de pLinker1, dando como resultado el vector pLinker-TDNST. Para construir el vector final, pGAMmodB2, se aisló el casete de expresión de quimosina de pLinker-TDNST como fragmento XbaI-SpeI de 4,4 kb y se ligó con el fragmento de vector XbaI-SpeI de 9 kb de pGAMmodB.

5 3.3 Transformación de CBS108914

Generación de protoplastos de cepa CBS108914

Se transformó la cepa CBS108914 con el plásmido pGAMmodB2 usando un procedimiento optimizado. Se inoculó la cepa CBS108914 en 20 ml de medio CSL (licor de maíz macerado 100 g/l, NaH₂PO₄·H₂O 1 g/l, MgSO₄ 0,5 g/l, antiespumante Mazu 2 g/l, maltosa 100 g/l, glucosa 10 g/l, fructosa 50 g/l, pH 5,8) y se incubó durante la noche a 37°C a 200-250 rpm. Se transfirieron 10 ml del precultivo a 100 ml de medio de *Aspergillus* completo (glucosa 10 g/l, NaNO₃ 6 g/l, KCl 0,52 g/l, KH₂PO₄ 1,52 g/l, 0,36 ml de KOH 10 M, uridina 2 g/l, NaNO₂ 20 mM, MgSO₄ 2 mM, tiamina 2 mg/l, riboflavina 2 mg/l, nicotinamida 2 mg/l, piridoxina 1 mg/l, ácido pantoténico 0,2 mg/l, biotina 4 mg/l, ZnSO₄ 2,2 mg/l, H₃BO₃ 1,1 mg/l, MnCl₂·4H₂O 0,5 mg/l, FeSO₄·7H₂O 0,5 mg/l, COCl₂·6H₂O 0,17 mg/l, CuSO₄·5H₂O 0,16 mg/l, Na₂MoO₄·2H₂O 0,15 mg/l EDTA, 5,0 mg/l) en un matraz de 500 ml sin deflectores. Se incubó este cultivo durante la noche a 37°C y 200-250 rpm. Se filtró el micelio sobre un trozo estéril de Myra cloth (Calbiochem) y se lavó una vez con agua estéril y una vez con NaCl/CaCl₂ 1700 mosmol (CaCl₂·2H₂O 0,27 M, NaCl 0,58 M). Se transfirió el micelio a un matraz estéril y se resuspendió en 20 ml de NaCl/CaCl₂ 1700 mosmol por gramo de micelio. Se añadieron 50 mg de enzima lítica (Sigma) por gramo de micelio. Se incubó la reacción de formación de protoplastos a 100 rpm y 37°C hasta que estuvo lista (muchos protoplastos libres). Se filtró la mezcla en hielo usando Myra cloth. Se le añadió un volumen igual de STC1700 (sorbitol 1,2 M, NaCl 35 mM, Tris.HCl 10 mM, pH 7,5, CaCl₂·2H₂O 50 mM) enfriado con hielo. Se recogieron los protoplastos mediante centrifugación durante 10 min en centrífuga de sobremesa a 2000 rpm a 4°C. Se resuspendió el sedimento en 20 ml de STC1700 enfriado con hielo y se recogieron de nuevo protoplastos mediante centrifugación durante 10 min en una centrífuga de sobremesa a 2000 rpm a 4°C. Se repitió una vez esta etapa de lavado. Se disolvió el sedimento de protoplastos final en STC1700 enfriado con hielo hasta una concentración final de 10x 10⁸ protoplastos/ml.

Transformación de la cepa CBS108914

Se mezclaron 2,10 x 10⁷ protoplastos con 2 µl de ATA (ácido aurintricarboxílico 0,5 M (Sigma) en etanol al 20%) y 10 µg de ADN de pGAMmodB2. Esto se incubó en hielo durante 25 minutos. Se añadieron 1350 µl de PTC (PEG 4000 al 60%, Tris.HCl 10 mM, pH 7,5, CaCl₂ 50 mM) en pequeñas gotas y se mezcló bien. Se incubó el tubo a temperatura ambiente. Después de exactamente 20 minutos, se llenó el tubo con STC1700 helado y se mezcló inmediatamente dando la vuelta al tubo. Se recogieron los protoplastos mediante centrifugación durante 10 minutos en una centrífuga de sobremesa a 2000 rpm a 4°C. Se disolvió el sedimento en 500 µl de STC1700. Esto se extendió sobre placas de regeneración selectiva (sorbitol 218 g/l, glucosa 10 g/l, NaNO₃ 6 g/l, KCl 0,52 g/l, KH₂PO₄ 1,52 g/l, 0,36 ml de KOH 10 M, uridina 2 g/l, agar 15 g/l, ZnSO₄·2,2 mg/l, H₃BO₃ 1,1 mg/l, MnCl₂·4H₂O 0,5 mg/l, FeSO₄·7H₂O 0,5 mg/l, COCl₂·6H₂O 0,17 mg/l, CuSO₄·5H₂O 0,16 mg/l, Na₂MoO₄·2H₂O 0,15 mg/l, EDTA 5,0 mg/l). Se incubaron las placas a 35°C durante 10 días.

Se purificaron aproximadamente 70 transformantes sobre placas de medio mínimo selectivo (idénticas a las placas de regeneración selectiva pero sin sorbitol) y se usaron colonias individuales para inocular placas de PDA (agar de patata y dextrosa, Oxoid). Se aislaron esporas y se almacenaron en glicerol al 20% a -80°C.

40 3.4 Análisis de transformantes

Se usaron esporas de transformantes para inocular 20 ml de medio CSL en matraces de agitación Erlenmeyer de 50 ml. Se incubaron los matraces de agitación 48 h a 37°C y 200. Se transfirieron 2 ml del cultivo a 20 ml de medio de inducción (maltosa 150 g/l, habas de soja DanPro 60 g/l, citrato de Na 70 g/l, sulfato de amonio 15 g/l, NaH₂PO₄ 1 g/l-H₂O, MgSO₄ 1 g/l, Tween 80 1 ml/l, arginina 1 mg/l, pH 6,0) y se incubaron los cultivos a 37°C, 200 rpm durante 8 días. Se tomaron muestras de medio de 1 ml en el día 7 y el día 8. Se determinaron las actividades de coagulación de la leche midiendo las actividades de coagulación de la leche en placas de microtitulación de 96 pocillos. Se seleccionaron los mejores productores y se examinaron en un tercer experimento en matraz de agitación a pequeña escala para confirmar los resultados obtenidos. Se sometió a prueba la producción de quimosina en fermentadores a escala piloto con dos transformantes seleccionados.

50 3.5 Análisis de proteínas

Se determinó la secuencia N-terminal de la quimosina resultante y se descubrió que era idéntica a la quimosina natural y a la quimosina producida en *Aspergillus* con el constructo de expresión de pGAMP_R.

3.6 Resultados

Después de 180 h se descubrió que los mejores transformantes de pGAMmodB2 producían por encima del 20% más que una cepa de referencia que produce quimosina bovina (véase la tabla 4 a continuación). La escisión autocatalítica de la molécula de glucoamilasa-quimosina dio como resultado una proteína idéntica a la natural tal

como se confirmó mediante secuenciación N-terminal.

Tabla 4: Muestra la producción de quimosina por transformantes de pGAMmodB2 en fermentaciones a escala piloto. Se comparan los niveles de producción con el nivel de producción por un transformante comparable de pGAMpR (PIM). Se determinaron las unidades de coagulación de la leche arbitrarias en diferentes puntos de tiempo durante la fermentación.

5

h	modB2#7	modB2#85a	modB2#85b	PIM
0	0	0	0	0
28	0	0	0	0
52	0	3	0	0
76	14	24	16	14
105	97	110	90	86
129	209	226	153	181
146	274	295	264	262
169	347	376	345	316
191	383	426	390	353

Estos resultados muestran que la introducción de una secuencia de ligador glicosilado entre una molécula transportadora fúngica y una proteína no fúngica es un método eficaz para aumentar los niveles de producción de proteínas en hongos, incluso aunque la molécula transportadora fúngica esté ya fuertemente glicosilada. Esta estrategia no requiere ningún cambio de la secuencia de aminoácidos en la enzima de interés, haciendo que sea una herramienta especialmente útil para la producción de enzimas para su uso en alimentos para animales y seres humanos.

10

EJEMPLO 4

Comparación de la actividad de la quimosina BM antes y después de desglucosilación

4.1 Introducción

En el ejemplo 2, se describió el desarrollo de la nueva cepa de *Aspergillus* que produce una quimosina BM (S293T). Esta cepa produce más quimosina BM glicosilada que produciría la cepa quimosina de ternero nativa. En este ejemplo se estudia el efecto del resto de glicano sobre la actividad de quimosina BM (S293T) y se compara con la actividad de quimosina de ternero nativa.

15

4.2 Materiales y métodos

Se determinaron las actividades de quimosina de ternero y quimosina BM (S293T) antes y después de desglucosilación con endoglucosidasa H (Rec. *E.Coli*, Boehringer, Mannheim, Alemania).

20

Se ajustaron muestras purificadas a 200 IMCU/ml con tampón acetato 80 mM, pH 5,5 y se incubaron muestras de 3 ml que contenían 600 IMCU y 0,15 U de endoglucosidasa H durante la noche a temperatura ambiente. Como control, se sustituyó la enzima por tampón acetato y también se incluyó. Se realizaron mediciones de actividad usando la norma 157A:1997 de Remcat Strength Analytical Method International IDF.

25

Se usó SDS-PAGE (tampón Bis-Tris al 4-12% mes Nupage, Novex, Ca) para determinar los niveles de glicosilación de las enzimas.

4.3 Resultados

La comparación de quimosina BM y quimosina de ternero en SDS-PAGE antes de desglucosilación reveló diferencias significativas en los niveles de glicosilación. La quimosina BM mostró glicosilación significativa aumentada.

30

Tal como se muestra en la tabla 5 a continuación, la glicosilación de la enzima tuvo un efecto inhibitor significativo sobre la actividad de coagulación de la leche de quimosina BM ya que la actividad de coagulación de la leche aumentó hasta el 32% de la actividad inicial cuando se desglucosiló la quimosina BM por endoglucosidasa H. Para la quimosina de ternero se encontró sólo un pequeño o ningún efecto ya que el aumento de actividad es insignificante.

Tabla 5 Actividades de coagulación de la leche de quimosina de ternero y quimosina BM antes y después de desglucosilación con endoglucosidasa H

35

Muestra	Actividad	n.º de muestras	Aumento de actividad por desglucosilación
<u>Quimosina BM</u>			
Glicosilada	217 IMCU/ml	3	
Desglucosilada	287 IMCU/ml	3	32%
<u>Quimosina de ternero nativa</u>			

Glicosilada	216 IMCU/ml	3	
Desglicosilada	222 IMCU/ml	3	2%

El aumento del 2% de la actividad tras desglicosilación de la quimosina de ternero nativa está dentro de la desviación estándar del método.

Bibliografía

- 5 Berka, R.M., Kodama, K.H., Rey, M.W., Wilson, L.J. and Ward, M. 1991. The development of *Aspergillus niger* var. *awamori* as a host for the expression and secretion of heterologous gene products. *Biochemical Society Transactions* 19:681-685.
- Dunn-Coleman, N.S., Bloebaum, P., Berka, R.M., Bodie, E., Robinson, N., Armstrong, G., Ward, M., Przetak, M., Carter, G.L., LaCost, R., Wilson, L.J., Kodoma, K.H., Baliu, E.F., Bower, B., Lamsa, M. and Heinsohn, H. 1991. Commercial levels of chymosin production by *Aspergillus*. *Bio/Technology* 9:976-980.
- 10 Gilliland, G.L., Winborne, E.L., Nachmann, J. and Wlodawer, A. 1990. The three-dimensional structure of recombinant bovine chymosin at 2.3 Å resolution. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 8:82-101.
- Sagt, C.M., Kleizen, B., Verwaal, R., de Jong, M.D., Muller, W.H., Smits, A., Visser, C., Boonstra, J., Verkleij, A.J., and Verrips, C.T. 2000. Introduction of an N-glycosylation site increases secretion of heterologous proteins in yeasts. *Appl Environ Microbiol.* Nov 66(11):4940-4.
- 15 Ward, M., Wilson, L.J., Kodoma, K.H., Rey, M.W. and Berka, R.M. 1990. Improved production of chymosin in *Aspergillus* by expression of glycoamylase-chymosin. *Bio/Technology* 8:435-440.
- Wallis, G.L.F., Swift, R.J., Hemming, F.W., Trinci, A.P.J., Peberdy, J.F. 1999. Glucoamylase overexpression and secretion in *aspergillus niger*: analysis of glycosylation. *Bio-chimica et Biophysica Acta* 1472, 576-586.
- 20 Harboe, M.H. 1998. *Rhizomucor miehei* aspartic proteinases having improved properties. *Aspartic proteinases* (ed. M. James), Plenum Press, NY.
- Peberdy, J.F. 1994. Protein secretion in filamentous fungi - trying to understand a highly productive black box. *TIBTECH*, 12, 50-57.

Lista de secuencias

- <110> Chr. Hansen A/S
- 25 Maarten van den Brink, Johannes
Harboe, Marianne K
Rahbek-Nielsen, Henrik
Petersen, Steen Guldager
- 30 <120> MÉTODO MEJORADO DE PRODUCCIÓN DE UN POLIPÉPTIDO DE PROTEASA ASPÁRTICA EN UN ORGANISMO HUÉSPED RECOMBINANTE
- <130> P1031PC00
- <140>
- <141>
- <150> PA 2002 00922
- 35 <151> 17-06-2002
- <160> 1
- <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
- <211> 323
- 40 <212> PRT
- <213> *Bos taurus*

<300>

<301> Gilliland, Gary L.

Winborne, Evon L.

Nachman, Joseph

5 Wlodawer, Alexander

<302> The three-dimensional structure of recombinant bovine chymosin at 2.3 Å resolution .

<303> Proteins

<304> 8

<305> 1

10 <306> 82-101

<307> 1990

<313> 1 A 323

<400> 1

Gly Glu Val Ala Ser Val Pro Leu Thr Asn Tyr Leu Asp Ser Gln Tyr
 1 5 10 15

Phe Gly Lys Ile Tyr Leu Gly Thr Pro Pro Gln Glu Phe Thr Val Leu
 20 25 30

Phe Asp Thr Gly Ser Ser Asp Phe Trp Val Pro Ser Ile Tyr Cys Lys

ES 2 707 384 T3

		35					40					45			
Ser	Asn	Ala	Cys	Lys	Asn	His	Gln	Arg	Phe	Asp	Pro	Arg	Lys	Ser	Ser
	50					55					60				
Thr	Phe	Gln	Asn	Leu	Gly	Lys	Pro	Leu	Ser	Ile	His	Tyr	Gly	Thr	Gly
65					70					75					80
Ser	Met	Gln	Gly	Ile	Leu	Gly	Tyr	Asp	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Asn	Ile
				85					90					95	
Val	Asp	Ile	Gln	Gln	Thr	Val	Gly	Leu	Ser	Thr	Gln	Glu	Pro	Gly	Asp
			100					105					110		
Val	Phe	Thr	Tyr	Ala	Glu	Phe	Asp	Gly	Ile	Leu	Gly	Met	Ala	Tyr	Pro
	115						120					125			
Ser	Leu	Ala	Ser	Glu	Tyr	Ser	Ile	Pro	Val	Phe	Asp	Asn	Met	Met	Asn
	130					135					140				
Arg	His	Leu	Val	Ala	Gln	Asp	Leu	Phe	Ser	Val	Tyr	Met	Asp	Arg	Asn
145					150						155				160
Gly	Gln	Glu	Ser	Met	Leu	Thr	Leu	Gly	Ala	Ile	Asp	Pro	Ser	Tyr	Tyr
				165					170					175	
Thr	Gly	Ser	Leu	His	Trp	Val	Pro	Val	Thr	Val	Gln	Gln	Tyr	Trp	Gln
			180					185					190		
Phe	Thr	Val	Asp	Ser	Val	Thr	Ile	Ser	Gly	Val	Val	Val	Ala	Cys	Glu
		195					200					205			
Gly	Gly	Cys	Gln	Ala	Ile	Leu	Asp	Thr	Gly	Thr	Ser	Lys	Leu	Val	Gly
	210					215					220				
Pro	Ser	Ser	Asp	Ile	Leu	Asn	Ile	Gln	Gln	Ala	Ile	Gly	Ala	Thr	Gln
225					230					235					240
Asn	Gln	Tyr	Gly	Glu	Phe	Asp	Ile	Asp	Cys	Asp	Asn	Leu	Ser	Tyr	Met
				245					250					255	
Pro	Thr	Val	Val	Phe	Glu	Ile	Asn	Gly	Lys	Met	Tyr	Pro	Leu	Thr	Pro
			260					265					270		
Ser	Ala	Tyr	Thr	Ser	Gln	Asp	Gln	Gly	Phe	Cys	Thr	Ser	Gly	Phe	Gln
		275					280					285			
Ser	Glu	Asn	His	Ser	Gln	Lys	Trp	Ile	Leu	Gly	Asp	Val	Phe	Ile	Arg
	290					295					300				

ES 2 707 384 T3

Glu Tyr Tyr Ser Val Phe Asp Arg Ala Asn Asn Leu Val Gly Leu Ala
305 310 315 320

Lys Ala Ile

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para obtener una secuencia de polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ADN que codifica para un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de proteasa aspártica, en el que el procedimiento comprende las etapas de modificar la secuencia de polinucleótido para codificar para un sitio de glicosilación N-X-T de polipéptido extra en la secuencia de aminoácidos de proteasa aspártica y aislar la secuencia de polinucleótido modificada que codifica para un polipéptido modificado, y en el que la proteasa aspártica es una quimosina.
2. Procedimiento para obtener una secuencia de polinucleótido aislado según la reivindicación 1, en el que la quimosina es una quimosina de mamífero.
3. Procedimiento para obtener una secuencia de polinucleótido aislado según la reivindicación 2, en el que la quimosina de mamífero es quimosina bovina.
4. Procedimiento para obtener una secuencia de polinucleótido aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el polipéptido se selecciona del grupo que consiste en preproquimosina, proquimosina y quimosina madura.
5. Procedimiento para obtener una secuencia de polinucleótido aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el polipéptido modificado comprende al menos un sitio -N-X-T- introducido en las posiciones 291-293 según la numeración de quimosina tal como se muestra en SEQ ID NO 1.
6. Procedimiento para obtener una secuencia de polinucleótido aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el polipéptido modificado comprende, dentro de la secuencia de aminoácidos de proteasa aspártica, un ligador artificial que comprende un sitio de N-glicosilación, preferiblemente un sitio de glicosilación N-X-T.
7. Procedimiento para obtener una secuencia de polinucleótido aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el polipéptido comprende una proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de proteasa aspártica conectada a una pareja de fusión.
8. Procedimiento para obtener una secuencia de polinucleótido aislado según la reivindicación 7, en el que la pareja de fusión se selecciona del grupo que consiste en glucoamilasa, alfa-amilasa, celobiohidrolasa y una parte de las mismas.
9. Procedimiento para obtener una secuencia de polinucleótido aislado según la reivindicación 6, en el que la secuencia de ligador artificial se sitúa entre una prosequencia y una pareja de fusión según la reivindicación 8.
10. Secuencia de polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ADN que codifica para un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de proteasa aspártica, obtenible mediante un procedimiento para obtener una secuencia de polinucleótido aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la secuencia de polinucleótido aislado codifica para un sitio de glicosilación N-X-T de polipéptido extra en la secuencia de aminoácidos de proteasa aspártica.
11. Método de producción de un polipéptido que presenta actividad proteasa aspártica que presenta las etapas de cultivar un organismo huésped que comprende una secuencia de polinucleótido aislado según la reivindicación 10 y aislar el polipéptido producido que presenta actividad proteasa aspártica, en el que el organismo huésped es una célula de levadura o una célula de hongo filamentoso.
12. Método de producción de un polipéptido aislado según la reivindicación 11, en el que el organismo huésped es una célula de hongo filamentoso es una célula de *Aspergillus* seleccionada preferiblemente del grupo que consiste en *Aspergillus niger* y *Aspergillus niger* var. *awamori*.
13. Polipéptido aislado que presenta actividad proteasa aspártica que comprende un sitio de glicosilación N-X-T, en el que el polipéptido que presenta actividad proteasa aspártica es una quimosina.
14. Polipéptido aislado según la reivindicación 13, en el que la quimosina es una quimosina de mamífero.
15. Polipéptido aislado según la reivindicación 14, en el que la quimosina de mamífero es quimosina bovina.
16. Polipéptido aislado según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que el polipéptido comprende al menos un sitio -N-X-T- introducido en las posiciones 291-293 según la numeración de quimosina tal como se muestra en SEQ ID NO 1.

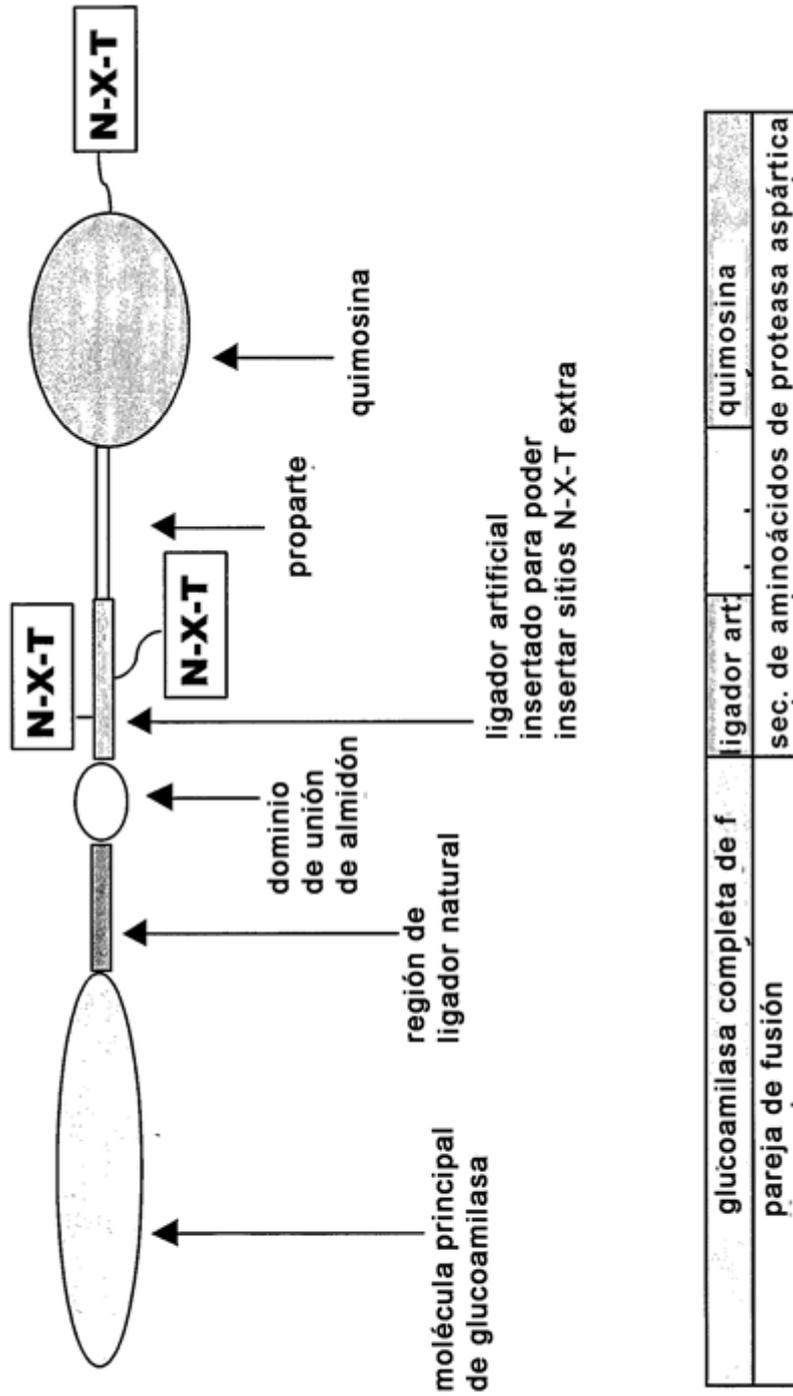


Fig. 1

Se indica en negrita (g-c) la mutación tal como se introdujo en el fragmento modB-XS

Sall
cggtcgaccgctacgggtgactgacacctggcgtgccgagatcactcgcacccccctctacaaggg :aagtctctgcgtaaggctctca

XhoI
 aggagcacgggtct**gctcgagg**attcctgcagaagcagcagctacggcatcagctctaagtacagc;gtttcggcgagggtggccagcg
 tgcctctcactaactacctggacagccagctactcggtaagatctacctggcactccccctcaggagltcaccgttctgttcgatactggg
 tccagcgacttctgggtccctccatctactgtaagagcaacgcttgcaagaaccaccagcgcttcg;itctcgaagtccagcaccttc

SphI
 cagaacctggcaagcccccttccatccactacgggtactggcag**catgcagg**gtatccttggctacgacaccgttaccgtgtccaacat
 cgtcgatattcagcagaccgtgggtctgagcaccaggagcctggcgatgtcttcacttacgccga;itcgatggtatcctcgcatgg

Bsr
 cttaccctccctggcctctgagctactctatccctgtgttcgacaacatgatgaaccgccacctcgtcgtcaggatctgttcagc**gtgta**

GI
catggaccgtaacggtcaggagtcocatgcttactctgggcgccatcgatccctcttactacaccggttccctccactgggttctgtgac
 cgtccagcagctactggcagttcaccgtggacagcgtcactatctccggcggtgttggttgcgaggggtggctgtcaggccatcctg
 atactggfaccagcaagctcgtcggccccctccagcgacatcctgaacatccagcaggctatcgggtg :caccagaaccagctaggcg
 agttcgatacgaactgcgataacctttcttacatgcctactgtggtttcagatcaacggtaagatgta;ccccttactccttctgcttacact
 tcccaggatcagggttctgtacctctggttccagctctgagaaccacagccagaagtggatccttggcgatgtcttcatccgcgagtact

XbaI
 actccgtcttcgaccgtccaacaacctgggtgggtctcctaaggccatctgatcct**ctag**agt

Fig. 2

SEQ ID --1

cggtcgaccgctacgggtgactgacacctggcgtgccgagatcactcgcacccccctacaaggggaagtctctgcgtaaggctctca
aggagcacgggtctgctcaggatttctgcagaagcagcagctacggcatcagcttaagtacagc;gtttcggcgaggtggccagcg
tcctctcactaactacctggacagccagtacttcggtaagatctacctggcactccccctcaggagltaccgttctgttcgatactggt
tccagcgacttctgggtccctccatctactgtaagagcaacgcttgcaagaaccaccagcgcttcg;itcctcgaagtcaccgaccttc
cagaacctggcaagcccccttccatccactacgggtactggcagcatgcag

SEQ-ID XXX-2

gcagcatgcagggtatccttggtacgacaccgttaccgtgtccaacatcgtcgatattcagcagaccgtgggtctgagcaccagga
gcctggcgatgtcttacttacgccgagttcagtggtatcctcggcatggcttaccctccctggcctctgagfactctatccctgtgttcg
acaacatgatgaaccgccacctcgtcgctcaggatctgttcagcgtgtacatg

SEQ-ID XXX-3

gcgtgtacatggaccgtaacggtcaggagtcctatgcttactctgggcgccatcgatcccttacta;accggttccctccactgggttc
ctgtgaccgtccagcagctactggcagttaccgtggacagcgtcactatctccggcgtggttgtggctltgcgagggtggctgtcaggcc
atccttgatactggtagcagc

SEQ-ID XXX-4

ctggtagcgaagctcgtcggccccctccagcgacatcctgaacatccagcaggctatcgggtgcc;cccagaaccagctacggcgag
ttcgatcgcactgcgataacctttcttacatgcctactgtggtttcagatcaacggtaagatgtacc;cccttactcctctgcttacacttc
ccaggatcagggtctctgtacctctggtttccagtctgagaaccacagccagaagtggatccttggc;gatgtcttcatccgcgagtacta
ctccgtcttcgaccgtgccacaacctgggtgggtctcgctaaggccatctgatcctctagagt

SEQ ID XXX-5

ctggtagcgaagctcgtcggccccctccagcgacatcctgaacatccagcaggctatcgggtgcc;cccagaaccagctacggcgag
ttcgatcgcactgcgataacctttcttacatgcctactgtggtttcagatcaacggtaagatgtacc;cccttactcctctgcttacacttc
ccaggatcagggtctctgtacctctggtttccagtctgagaaccacacccagaagtggatccttggc;gatgtcttcatccgcgagtacta
ctccgtcttcgaccgtgccacaacctgggtgggtctcgctaaggccatctgatcctctagagt

SEQ ID XXX-6

ggccagggcgcgcttccatggaagaatcgggccgctaaaccatcgatggctcaggttggcgcgca

Fig. 3