

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 718 071**

(51) Int. Cl.:

C12C 11/00 (2006.01)

C12N 9/62 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.06.2015 PCT/EP2015/062328**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **10.12.2015 WO15185593**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.06.2015 E 15727383 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019 EP 3152305**

(54) Título: **Endoproteasa específica para prolina y su uso**

(30) Prioridad:

**03.06.2014 EP 14170879
17.06.2014 EP 14172644
17.06.2014 EP 14172645**

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

27.06.2019

(73) Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL**

(72) Inventor/es:

**LAAN, VAN DER, JAN METSKE;
BRUINE-PAULUS, DE, ANGELA;
CHRISTIS, CHANTAL;
SPAANS, MARTINE y
VONDERVOORT, VAN DE, PETER JOZEF IDA**

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 718 071 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

Endoproteasa específica para prolina y su uso

La presente invención se refiere a un polipéptido que tiene actividad de endoproteasa específica para prolina, una composición que comprende el polipéptido, un ácido nucleico que codifica una endoproteasa específica para prolina, un vector de expresión que comprende el ácido nucleico que codifica una endoproteasa específica para prolina, una célula hospedante recombinante, un método para preparar una endoproteasa específica para prolina y un proceso para preparar un producto alimentario o pienso en donde se usa la endoproteasa específica para prolina.

Antecedentes

Las endoproteasas específicas para prolina son enzimas que hidrolizan una proteína o péptido en una posición donde hay una prolina en la proteína o péptido.

Una endoproteasa específica para prolina puede derivar, por ejemplo, de *Aspergillus niger* o *Penicillium chrysogenum*, tal como se describe en WO2002/046381 y WO2009/144269, respectivamente.

Otra endoproteasa específica para prolina se conoce a partir de WO2012/174127. El documento WO2012/174127 describe una proteasa específica para prolina de *Botryotinia fuckeliana*, *Aspergillus clavatus*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Mycosphaerella graminicola*, *Neuropspora crasse*, *Talaromyces stipitatus* y *Gibberella zae*.

Una endoproteasa específica para prolina se puede usar en diversas aplicaciones, por ejemplo, en la degradación del gluten (véase, por ejemplo, WO2005/027953 o WO2003/068170). El gluten es la fracción de proteína insoluble de cereales como el trigo, centeno, avena y cebada. El gluten es una mezcla compleja de moléculas de glutenina y prolamina que se cree que causan efectos tóxicos, por ejemplo, en pacientes que padecen enfermedad celíaca. Se considera que la celiaquía o enfermedad celíaca es una enfermedad autoinmunitaria. Los pacientes que padecen celiaquía deben seguir una dieta estricta sin gluten, que es muy difícil de seguir porque el gluten se usa tan ampliamente. El uso de endoproteasa específica para prolina como medicamento o suplemento alimentario puede aliviar la necesidad de una dieta estricta sin gluten (WO2003/068170).

Las endoproteasas específicas para prolina también se usan para reducir la turbidez en la cerveza, en donde la proteasa específica para prolina se puede agregar durante varias etapas de un proceso de producción de cerveza (WO 2002/046381).

Es deseable que las enzimas en aplicaciones alimentarias y de pienso tengan un pH óptimo adecuado y que preferiblemente no sean activas en el alimento o bebida final.

El objetivo de la presente invención es una endoproteasa específica para prolina alternativa con características mejoradas.

Compendio

En un aspecto, la presente descripción se refiere a un polipéptido que tiene actividad de endoproteasa específica para prolina, en donde el polipéptido tiene menos de 70 % de actividad residual sobre acetil-AlaAlaPro-paranitroanilina (Ac-AAP-pNA) como sustrato después de que el polipéptido se ha mantenido a una temperatura de 65 °C durante 15 min. La actividad residual de un polipéptido que tiene actividad de endoproteasa específica para prolina se determina, de manera ventajosa, mediante el uso de acetil-AlaAlaPro-paranitroanilina (Ac-AAP-pNA) como sustrato a una temperatura de 20 °C y a pH 4,5, por ejemplo, en un tampón a pH 4,5, por ejemplo, un tampón de acetato de sodio (NaAc), que puede comprender una sal adicional tal como NaCl. La actividad residual se puede determinar al incubar un polipéptido, según se describe en la presente memoria, a una temperatura de 20 °C, y a un pH 4,5 durante 60 min.

La presente descripción se refiere a un polipéptido que tiene actividad de endoproteasa específica para prolina, en donde el polipéptido se selecciona del grupo que consiste en un polipéptido que tiene actividad de endoproteasa específica para prolina, opcionalmente que tiene menos de 70 % de actividad residual después de que el polipéptido se ha mantenido a una temperatura de 65 °C durante 15 min, en donde el polipéptido se selecciona del grupo que consiste en:

i. un polipéptido, que, cuando se alinea con una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 1 comprende una sustitución de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 469, en donde la posición se define con respecto a la SEQ ID NO: 1;

ii. un polipéptido, que, cuando se alinea con una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 1 comprende una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en Ala (A), Cys (C), Asp (D), Glu (E), Phe (F), Gly (G),

His (H), Ile (I), Lys (K), Leu (L), Met (M), Asn (N), Gln (Q), Arg (R), Ser (S), Thr (T), Val (V), Trp (W) y Tyr (Y) en una posición correspondiente a la posición 469, en donde la posición se define con respecto a la SEQ ID NO:1;

iii. un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 1, en donde la SEQ ID NO: 1 comprende al menos una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en P469A, P469C, P469D,

5 P469E, P469F, P469G, P469H, P469I, P469K, P469L, P469M, P469N, P469Q, P469R, P469S, P469T, P469V, P469W y P469Y, en donde las sustituciones de aminoácidos se definen con respecto a la SEQ ID NO: 1;

iv. un polipéptido según i) a iii), pero que carece de una secuencia señal y/o una secuencia proproteína;

v. un polipéptido según i) a iv), en donde el polipéptido tiene al menos 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 1;

10 vi. un polipéptido codificado por un ácido nucleico que tiene al menos 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o 100 % de identidad con respecto a la SEQ ID NO: 2, o con respecto a una secuencia codificante madura de la SEQ ID NO: 2, en donde la SEQ ID NO: 2 comprende al menos una mutación que codifica al menos una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo P469A, P469C, P469D,

15 P469E, P469F, P469G, P469H, P469I, P469K, P469L, P469M, P469N, P469Q, P469R, P469S, P469T, P469V, P469W y P469Y, en donde las sustituciones de aminoácidos se definen con respecto a la SEQ ID NO: 1.

La invención también proporciona una composición que comprende un polipéptido que tiene endoproteasa específica para prolina según se describe en la presente memoria.

20 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para generar un polipéptido variante que tiene actividad de endoproteasa específica para prolina según se describe en la presente memoria.

La descripción también proporciona un ácido nucleico que codifica una endoproteasa específica para prolina que tiene al menos 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad secuencial con respecto a la SEQ ID NO: 2, o con respecto a una secuencia codificante madura de la SEQ ID NO: 2, en donde la SEQ ID NO: 2 comprende al menos una mutación que codifica al menos una sustitución de aminoácido

25 seleccionada del grupo que consiste en P469A, P469C, P469D, P469E, P469F, P469G, P469H, P469I, P469K, P469L, P469M, P469N, P469Q, P469R, P469S, P469T, P469V, P469W y P469Y, en donde las sustituciones de aminoácidos se definen con respecto a la SEQ ID NO: 1.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido según se describe en la presente memoria.

30 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una célula hospedante recombinante que comprende una secuencia polinucleotídica o un vector de expresión según se describe en la presente memoria.

En otro aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para la preparación de un polipéptido, que comprende cultivar una célula hospedante según se describe en la presente memoria, en condiciones que permiten la expresión del polipéptido y preparar el polipéptido.

35 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un proceso para la preparación de un producto alimentario o pienso que comprende incubar una forma intermediaria del producto alimentario o pienso con un polipéptido, o una composición que comprende un polipéptido según se describe en la presente memoria, y preparar el producto alimentario.

40 La presente descripción también se refiere a un producto alimentario o pienso obtenible mediante un proceso según se describe en la presente memoria.

Definiciones

El término "productos horneados" se define en la presente memoria como cualquier producto preparado a partir de una masa o una mezcla. El producto puede tener un carácter suave o crujiente y puede ser de tipo blanco, claro u oscuro. Los productos horneados incluyen, pero no se limitan a, pan tal como, por ejemplo, pan blanco, pan integral

45 o de centeno, pan tipo baguette francés, productos de masa laminados tal como pastel (danés), medialuna u hojaldre, pan de pita, tortillas, tacos, tortas, panqueques, biscochos, galletas, donas, roscas, tapas de masa, bollos, pan al vapor y galleta al agua. Los tipos de productos horneados, los métodos para caracterizarlos y producirlos son conocidos para los expertos en la técnica, véase, por ejemplo, "Baking Science and Technology", por E.J. Pyler, L.A. Gorton, 2008, (2 tomos) Sosland Publishing Company, Kansas, EE. UU., o "Baked Products: Science, Technology and Practice" por S.P. Cauvain, L.S. Young, 2006, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, RU.

50 El término "cadena complementaria" se puede usar de manera intercambiable con el término "complemento". El complemento de una cadena de ácido nucleico puede ser el complemento de una cadena codificante o el

complemento de una cadena no codificante. Cuando se hace referencia a ácidos nucleicos bicatenarios, el complemento de un ácido nucleico que codifica un polipéptido hace referencia a la cadena complementaria de la cadena que codifica la secuencia de aminoácidos o a cualquier molécula de ácido nucleico que la contiene.

- 5 El término "secuencia de control" se puede usar de manera intercambiable con el término "secuencia de ácido nucleico reguladora de la expresión". El término, según se usa en la presente memoria, se refiere a secuencias de ácido nucleico necesarias para y/o que afectan la expresión de una secuencia codificante enlazada funcionalmente en un organismo hospedante particular o *in vitro*. Cuando dos secuencias de ácido nucleico están enlazadas funcionalmente, normalmente estarán en la misma orientación y también en el mismo marco de lectura. Normalmente serán esencialmente contiguas, aunque esto puede no ser necesario. Las secuencias de ácido nucleico que regulan la expresión, tal como *inter alia*, secuencias de iniciación de transcripción, de terminación, promotoras, líderes, péptido señal, propéptido, prepropéptido o potenciadoras adecuadas; secuencia de Shine-Dalgarno, secuencias represoras o activadoras; señales de procesamiento de ARN eficaces tales como señales de empalme y poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplasmático; secuencias que potencian la eficacia de traducción (p. ej., sitios de unión a ribosoma); secuencias que potencian la estabilidad de la proteína; y, 10 cuando se desea, secuencias que potencian la secreción de la proteína, pueden ser cualquier secuencia de ácido nucleico que exhibe actividad en el organismo hospedante de elección y que se puede derivar de genes que codifican proteínas, que son endógenos o heterólogos con respecto a una célula hospedante. Cada secuencia de control puede ser natural o extraña para la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido. Cuando se desea, 15 la secuencia de control se puede proporcionar con enlazadores con el fin de introducir sitios de restricción específicos que facilitan la ligadura de las secuencias de control con la región codificante de la secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido. Las secuencias de control se pueden optimizar para su fin específico.

- 20 Un "producto lácteo" se refiere a cualquier tipo de producto a base de leche previsto para su uso como alimento, pienso o bebida que incluyen, pero no se limitan a, queso, leche, leche desnatada, leche acidificada, suero de mantequilla, leche condensada, pastas para untar, margarinas, yogur, helado, leche en polvo, mantequilla, EMC (siglas en inglés para "queso modificado enzimáticamente"), dulce de leche, blanqueador para café; crema para café, nata, ghee, análogo lácteo, etc. El queso puede ser cualquier tipo de queso, p. ej., queso fresco, queso duro, queso 25 en grano, queso crema, queso con moho blanco, queso con moho azul y queso procesado. Los ejemplos de queso fresco son la ricota, el queso crema, el Neufchatel o el requesón. Los ejemplos de queso duro son Chester, Danbo, Manchego, Saint Paulin, Cheddar, Monterey, Colby, Edam, Gouda, Muenster, de tipo suizo, Gruyere, Emmental, 30 Parmigiano Reggiano, Grana Padano, Parmesano, Pecorino, Provolone y Romano. Los ejemplos de queso en grano son el queso Feta, el queso Quotija, el queso pasta filata tal como la Mozzarella y el Queso fresco. Los ejemplos de queso crema son el queso Filadelfia. Los ejemplos de queso de moho blanco son el queso Brie y el Camembert. Los ejemplos de queso de moho azul son el queso Gorgonzola y el danés azul.

- 35 Según se usa en la presente memoria, el término "endógeno" se refiere a una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos que se origina naturalmente en un hospedante.

- 40 Las endopeptidasas o endoproteinasas son capaces de descomponer los enlaces peptídicos de aminoácidos no terminales (es decir, dentro de la proteína), a diferencia de las exopeptidasas, que descomponen los enlaces peptídicos del extremo amínico o el carboxílico. Las endopeptidasas no tienden a descomponer los péptidos en monómeros, sino que resultan en fragmentos peptídicos relativamente grandes. La generación específica de fragmentos relativamente grandes se prefiere en gran medida en muchas aplicaciones relacionadas con alimentos y piensos. Un caso específico de endopeptidasa es la oligopeptidasa, cuyos sustratos son oligopéptidos en lugar de 45 proteínas.

El término "expresión" incluye cualquier etapa relacionada con la producción del polipéptido que incluye, pero no se limita a, transcripción, modificación postranscripción, traducción, modificación postraducción y secreción.

- 50 Los polinucleótidos de la presente invención, según se describen en la presente memoria, se pueden sobreexpresar en una célula hospedante de la invención en comparación con una célula genitora en la que dicho gen no se sobreexpresa. La sobreexpresión de una secuencia polinucleotídica se define en la presente memoria como la expresión de dicho gen de secuencia que resulta en una actividad del polipéptido codificado por la dicha secuencia en una célula hospedante que es al menos 1,1, al menos 1,25 o al menos 1,5 veces mayor que la actividad del polipéptido en la célula hospedante; preferiblemente, la actividad de dicho polipéptido es al menos 2 veces, más preferiblemente, al menos 3 veces, más preferiblemente, al menos 4 veces, más preferiblemente, al menos 5 veces, incluso más preferiblemente, al menos 10 veces y, lo más preferiblemente, al menos 20 veces mayor que la actividad del polipéptido en la célula genitora.

- 55 Un vector de expresión comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido, tal como un polipéptido según la presente invención, enlazado funcionalmente con las secuencias de control adecuadas (tal como un promotor, y señales de terminación de la transcripción y traducción) para la expresión y/o traducción *in vitro*, o en una célula hospedante del polinucleótido.

- El vector de expresión puede ser cualquier vector (p. ej., un plásmido o virus), que se puede someter convenientemente a procedimientos de ADN recombinante y provocar la expresión del polinucleótido. La elección del vector típicamente dependerá de la compatibilidad del vector con la célula en la que el vector se va a introducir. Los vectores pueden plásmidos lineales o circulares cerrados. El vector puede ser un vector que se replica de manera autónoma, es decir, un vector, que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, p. ej., un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula hospedante, se integra en el genoma y se replica junto con el(s) cromosoma(s) en el(s) que se ha integrado. El vector de clonación integradora se puede integrar en un locus aleatorio o uno diana predeterminado en los cromosomas de la célula hospedante. El sistema de vector puede ser un vector o plásmido simple o dos o más vectores o plásmidos, que juntos contienen el ADN total que se va a introducir en el genoma de la célula hospedante, o un transposón. Un vector de la invención puede comprender uno, dos o más, por ejemplo, tres, cuatro o cinco polinucleótidos de la invención, por ejemplo, para la sobreexpresión.
- El término "gen", según se usa en la presente memoria, hace referencia a un segmento de una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena polipeptídica, que puede o no incluir secuencias reguladoras para el gen antes y después de la secuencia codificante, p. ej., promotores, potenciadores, etc., así como secuencias intercaladas (intrones) entre segmentos codificantes individuales (exones). Se apreciará, además, que la definición de gen puede incluir ácidos nucleicos que no codifican un polipéptido, sino que proporcionan plantillas para la transcripción de moléculas de ARN funcionales tales como ARNr, ARNt, etc.
- Una célula hospedante, según se define en la presente memoria, es un organismo adecuado para manipulación genética y que se puede cultivar a densidades celulares útiles para producción industrial de un producto diana, tal como un polipéptido según la presente invención. Una célula hospedante puede ser una célula hospedante que se encuentra en la naturaleza o una célula hospedante derivada de una célula hospedante genitora después de la manipulación genética o mutagénesis clásica. De manera ventajosa, una célula hospedante es una célula hospedante recombinante. Una célula hospedante puede ser una célula hospedante procariota, arqueobacteriana o eucariota. Una célula hospedante procariota puede ser, pero no se limita a, una célula hospedante bacteriana. Una célula hospedante eucariota puede ser, pero no se limita a, una célula hospedante de levadura, de hongo, de ameba, de alga, de planta, de animal o de insecto.
- El término "heterólogo", según se usa en la presente memoria, se refiere a secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos que no se originan naturalmente en una célula hospedante. En otras palabras, la secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos no es idéntica a la que se encuentra naturalmente en la célula hospedante.
- El término "hibridación" significa el apareamiento de cadenas sustancialmente complementarias de compuestos oligoméricos, tales como compuestos de ácido nucleico. La hibridación se puede llevar a cabo en condiciones de rigurosidad baja, media o alta. Las condiciones de hibridación de rigurosidad baja comprenden hibridación en 6X cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC, por sus siglas en inglés) a aproximadamente 45 °C, posteriormente dos lavados en 0,2 X de SSC, SDS al 0,1 % a al menos 50 °C (la temperatura de los lavados se puede aumentar hasta 55 °C para condiciones de rigurosidad baja). Las condiciones de hibridación de rigurosidad media comprenden hibridación en 6X de SSC a aproximadamente 45 °C, posteriormente uno o más lavados en 0,2 X de SSC, SDS al 0,1 % a 60 °C y las condiciones de hibridación de rigurosidad alta comprenden hibridación en 6X de SSC a aproximadamente 45 °C, posteriormente uno o más lavados en 0,2X de SSC, SDS al 0,1 % a 65 °C.
- Una secuencia de ácido nucleico o polinucleotídica se define en la presente memoria como un polímero nucleotídico que comprende al menos 5 unidades de nucleótido o ácido nucleico. Un nucleótido o ácido nucleico se refiere a ARN y ADN. Los términos "ácido nucleico" y "secuencia polinucleotídica" se usan de manera intercambiable en la presente memoria.
- Un "péptido" se refiere a una cadena corta de residuos aminoacídicos enlazados mediante enlaces peptídicos (amida). El péptido más corto, un dipéptido, consiste en 2 aminoácidos unidos mediante un enlace peptídico simple.
- El término "polipéptido" se refiere a una molécula que comprende residuos aminoacídicos enlazados mediante enlaces peptídicos y que contiene más de cinco residuos aminoacídicos. El término "proteína", según se usa en la presente memoria, es sinónimos del término "polipéptido" y también puede hacer referencia a dos o más polipéptidos. Por lo tanto, los términos "proteína" y "polipéptido" se pueden usar de manera intercambiable. Los polipéptidos opcionalmente se pueden modificar (p. ej., glucosilar, fosforilar, acilar, farnesilar, prenilar, sulfonar y similares) para agregar funcionalidad. Los polipéptidos que exhiben actividad en presencia de un sustrato específico en ciertas condiciones pueden denominarse enzimas. Se entenderá que, como resultado de la degeneración del código genético, se puede producir una multitud de secuencias nucleotídicas que codifican un polipéptido dado.
- Un "fragmento de ácido nucleico aislado" es un fragmento de ácido nucleico que no se origina naturalmente como un fragmento y no se encontraría en estado natural.

El término "polipéptido aislado", según se usa en la presente memoria, significa un polipéptido que se retira de al menos un componente, p. ej., otro material polipeptídico, con el cual se asocia naturalmente. El polipéptido aislado puede estar libre de cualesquiera otras impurezas. El polipéptido aislado puede ser al menos 50 % puro, p. ej., al menos 60 % puro, al menos 70 % puro, al menos 75 % puro, al menos 80 % puro, al menos 85 % puro, al menos 80 % puro, al menos 90 % puro, o al menos 95 % puro, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 99,9 %, según se determina mediante SDS-PAGE o cualquier otro método analítico adecuado con este fin y conocido para el experto en la técnica. Un polipéptido aislado se puede producir mediante una célula hospedante recombinante.

Un "polipéptido maduro" se define en la presente memoria como un polipéptido en su forma final y se obtiene después de la traducción de un ARNm en polipéptido y las modificaciones postraducción de dicho polipéptido. La modificación postraducción incluye procesamiento del extremo N, truncamiento del extremo C, glucosilación, fosforilación y extracción de secuencias líderes tales como péptidos señal, propéptidos y/o prepropéptidos mediante escisión.

Una "secuencia codificante de polipéptido maduro" significa un polinucleótido que codifica un polipéptido maduro.

El término "construcción de ácido nucleico" se refiere en la presente memoria a una molécula de ácido nucleico, ya sea mono o bicatenaria, que se aísla de un gen de origen natural o que ha sido modificada para que contenga segmentos de ácido nucleico que se combinan y yuxtaponen de una manera que no existiría de cualquier otra manera en la naturaleza. El término construcción de ácido nucleico es sinónimo del término "casete de expresión" o "vector de expresión" cuando la construcción de ácido nucleico contiene todas las secuencias de control necesarias para la expresión de una secuencia codificante, en donde dichas secuencias de control se enlazan funcionalmente con dicha secuencia codificante.

Una "endoproteasa específica para prolina" es una proteasa que hidroliza una proteína o péptido en una posición donde la proteína o péptido contiene un residuo prolina. Una endoproteasa específica para prolina puede tener actividad de endoproteasa específica para prolina y/o de oligopeptidasa específica para prolina (EC3.4.21.26). Una endoproteasa específica para prolina es preferiblemente una enzima que hidroliza un enlace peptídico en el extremo carboxílico de residuos prolina, que resulta en un fragmento de péptido y/o polipéptido con una prolina en el extremo C.

El término "promotor" se define en la presente memoria como una secuencia de ADN que se une a ARN polimerasa y dirige la polimerasa al sitio de inicio de la transcripción posterior correcto de una secuencia de ácido nucleico para iniciar la transcripción.

El término "recombinante" cuando se usa en referencia a una célula, ácido nucleico, proteína o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector se ha modificado mediante la introducción de un ácido nucleico o proteína heterólogo o la alteración de un ácido nucleico o proteína natural, o que la célula deriva de una célula modificada de esta forma. Por lo tanto, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma natural (no recombinante) de la célula o expresan genes naturales que de cualquier otra manera se expresan de manera anormal, se subexpresan o no se expresan en absoluto. El término "recombinante" es sinónimo de "genéticamente modificado" y "transgénico".

"Identidad secuencial", u homología secuencial se usan de manera intercambiable en la presente memoria. A los efectos de la presente invención, se define en la presente que para determinar el porcentaje de homología secuencial o identidad secuencial de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácido nucleico, las secuencias se alinean para una comparación óptima. Para optimizar la alineación entre las dos secuencias, se pueden introducir espacios en cualquiera de las dos secuencias que se comparan. Dicha alineación se puede llevar a cabo a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se comparan. Alternativamente, la alineación se puede llevar a cabo a lo largo de una longitud más corta, por ejemplo, a lo largo de aproximadamente 20, aproximadamente 50, aproximadamente 100 o más ácidos nucleicos/bases o aminoácidos. La identidad secuencial es el porcentaje de coincidencias idénticas entre las dos secuencias a lo largo de la región alineada informada. El porcentaje de identidad secuencial entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias nucleotídicas se puede determinar usando el algoritmo de Needleman y Wunsch para la alineación de dos secuencias. (Needleman, S. B. and Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453). Las secuencias de aminoácidos y las secuencias nucleotídicas se pueden alinear mediante el algoritmo. El algoritmo de Needleman-Wunsch se ha implementado en el programa informático NEEDLE. A los efectos de la presente invención, se usó el programa NEEDLE del paquete EMBOSS (versión 2.8.0 o más alta, EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite (2000) Rice, P. Longden, I. y Bleasby, A. Trends in Genetics 16, (6) págs. 276-277, <http://emboss.bioinformatics.nl/>). Para las secuencias proteicas, se usa EBLOSUM62 para la matriz de sustitución. Para la secuencia nucleotídica se usa EDNAFULL. Los parámetros opcionales que se usan son una penalización por espacio abierto de 10 y una penalización por extensión de espacio de 0,5. El experto apreciará que todos estos parámetros diferentes proporcionarán resultados ligeramente diferentes, pero que el porcentaje de identidad global de dos secuencias no se altera significativamente cuando se usan algoritmos diferentes.

Después de la alineación mediante el programa NEEDLE, según se describió anteriormente, se calcula el porcentaje de identidad secuencial entre una secuencia de consulta y una secuencia de la invención de la siguiente manera: Cantidad de posiciones correspondientes en la alineación que exhiben un aminoácido idéntico o nucleótido idéntico en ambas secuencias dividida entre la longitud total de la alineación después de restar la cantidad total de espacios en la alineación. La identidad, según se define en la presente memoria, se puede obtener a partir de NEEDLE mediante el uso de la opción NOBRIEF y se etiqueta en el resultado del programa como "identidad más larga".

Las secuencias de ácido nucleico y proteína de la presente invención se pueden usar adicionalmente como una "secuencia de consulta" para llevar a cabo una búsqueda en bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar otros miembros de la familia o secuencias relacionadas. Dichas búsquedas se pueden llevar a cabo mediante el uso de los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Las búsquedas de nucleótidos por BLAST se pueden llevar a cabo con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra= 12 para obtener secuencias nucleotídicas homólogas a las moléculas de ácido nucleico de la invención. Las búsquedas de proteína por BLAST se pueden llevar a cabo con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra= 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteína de la invención. Para obtener alineaciones especiadas para hacer comparaciones, se puede usar Gapped BLAST según se describe en Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17): 3389-3402. Cuando se usan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden usar los parámetros predeterminados de los respectivos programas (p. ej., XBLAST y NBLAST). Véase la página de inicio del National Center for Biotechnology Information en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

El término "sustancialmente puro" con respecto a polipéptidos se refiere a una preparación polipeptídica que contiene como mucho 50 % en peso de otro material polipeptídico. Los polipéptidos descritos en la presente memoria están preferiblemente en una forma sustancialmente pura. En particular, se prefiere que los polipéptidos descritos en la presente memoria estén en "forma esencialmente pura", es decir, que la preparación polipeptídica esté esencialmente libre de otro material polipeptídico. Opcionalmente, el polipéptido también puede estar esencialmente libre de material no polipeptídico, tal como ácidos nucleicos, lípidos, componentes de medios y similares. En la presente memoria, el término "polipéptido sustancialmente puro" es sinónimo de los términos "polipéptido aislado" y "polipéptido en forma aislada". El término "sustancialmente puro" con respecto a un polinucleótido se refiere a una preparación polinucleotídica que contiene como mucho 50 % en peso de otro material polinucleotídico. Los polinucleótidos descritos en la presente memoria están preferiblemente en una forma sustancialmente pura. En particular, se prefiere que el polinucleótido descrito en la presente memoria esté en "forma esencialmente pura", es decir, que la preparación polinucleotídica esté esencialmente libre de otro material polinucleotídico. Opcionalmente, el polinucleótido también puede estar esencialmente libre de material no polinucleotídico, tal como polipéptidos, lípidos, componentes de medios y similares. En la presente memoria, el término "polinucleótido sustancialmente puro" es sinónimo de los términos "polinucleótido aislado" y "polinucleótido en forma aislada".

Una "sustitución", según se usa en la presente memoria, en relación con polipéptidos o ácidos nucleicos, denota el reemplazo de uno o más aminoácidos en una secuencia polipeptídica o de uno o más nucleótidos en una secuencia polinucleotídica, respectivamente, por diferentes aminoácidos o nucleótidos, respectivamente. Por ejemplo, una sustitución indica que una posición en un polipéptido, según se describe en la presente memoria, tal como un polipéptido variante, que corresponde a al menos una posición establecida anteriormente en la SEQ ID NO: 1, comprende un residuo aminoacídico que no aparece en dicha posición en el polipéptido genitor (por ejemplo, la secuencia genitora de la SEQ ID NO: 1).

Una "molécula sintética", tal como un ácido nucleico sintético o un polipéptido sintético se produce mediante síntesis química o enzimática *in vitro*. Incluye, pero no se limita a, ácidos nucleicos variantes producidos con uso óptimo de codones para organismos hospedantes de elección.

Un ácido nucleico sintético se puede optimizar para el uso de codones, preferiblemente, según los métodos descritos en WO2006/077258 y/o WO2008000632, que se incorporan en la presente memoria por referencia. WO2008/000632 se refiere a la optimización de un par de codones. La optimización de un par de codones es un método en donde las secuencias nucleotídicas que codifican un polipéptido que se han modificado con respecto a su uso de codones, en particular, los pares de codones que se usan, se optimizan para obtener expresión mejorada de la secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido y/o producción mejorada del polipéptido codificado. Los pares de codones se definen como un conjunto de dos tripletes posteriores (codones) en una secuencia codificante. Los expertos en la técnica sabrán que el uso de codones debe adaptarse dependiendo de la especie hospedante y posiblemente resulta en variantes con desviación de homología significativa con respecto a la SEQ ID NO: 2, pero que todavía codifican el polipéptido según la invención.

55

Según se usan en la presente memoria, los términos "variante", "derivado", "mutante" u "homólogo" se pueden usar de manera intercambiable. Pueden hacer referencia a polipéptidos o ácidos nucleicos. Las variantes incluyen sustituciones, inserciones, eliminaciones, truncamientos, transversiones e/o inversiones, en una o más ubicaciones con respecto a una secuencia de referencia. Las variantes se pueden producir, por ejemplo, mediante mutagénesis

de saturación de sitio, mutagénesis de exploración, mutagénesis de inserción, mutagénesis aleatoria, mutagénesis dirigida al sitio y evolución dirigida, así como diversas otras estrategias de recombinación conocidas para un experto en la técnica. Los genes variantes de ácidos nucleicos se pueden sintetizar artificialmente mediante técnicas conocidas en la técnica.

5 Figuras

Figura 1: vector pGBTOP-16 usado para clonar el gen GLA. El vector pGBTOP-16 deriva del vector pGBTOP-12 descrito en WO 2011/009700. Además de pGBTOP-12, contiene el gen ccdB de E. coli para selección positiva para la presencia de un inserto entre los sitios de clonación EcoRI y Pael. El sitio de restricción Pael reemplaza el sitio de restricción SnaBI presente en pGBTOP-12. Este vector se linealiza mediante digestión por NotI antes de la transformación.

Figura 2. Alineación de la endoproteasa específica para prolina de referencia de *Aspergillus niger* con endoproteasas específicas para prolina homólogas derivadas de *A. carbonarius*, *A. flavus*, *A. aculeatus* y *Rasamsonia emersonii*. La alineación se lleva a cabo con el programa ClustalW tal como se implementa en el programa BioEdit de North Carolina State University (NCSU) mbio. (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>).

Secuencias

SEQ ID NO: 1: Secuencia de aminoácidos de la endoproteasa específica para prolina de *Aspergillus niger* que contiene una secuencia señal de pectinametilesterasa.

SEQ ID NO: 2: Secuencia de ácido nucleico de la endoproteasa específica para prolina de *Aspergillus niger* que contiene una secuencia señal de pectinametilesterasa.

SEQ ID NO: 3 Secuencia de aminoácidos de citocromo C de corazón de caballo.

SEQ ID NO: 4: Fragmento de citocromo C digerido con una PEP según la presente invención

SEQ ID NO: 5: Fragmento de citocromo C digerido con una PEP según la presente invención

SEQ ID NO: 6: Fragmento de citocromo C digerido con una PEP según la presente invención

25 SEQ ID NO: 7: Fragmento de citocromo C digerido con una PEP según la presente invención

SEQ ID NO: 8: Fragmento de citocromo C digerido con una PEP según la presente invención

SEQ ID NO: 9: Secuencia de aminoácidos de la endoproteasa específica para prolina (PEP, por sus siglas en inglés) BC2G075 de *Aspergillus carbonarius* con secuencia señal de pectinametilesterasa de *A. niger* y prosecuencia de PEP de *A. niger*

30 SEQ ID NO: 10: Secuencia de aminoácidos de la endoproteasa específica para prolina (PEP) BC2G077 de *Aspergillus flavus* con secuencia señal de pectinametilesterasa de *A. niger* y prosecuencia de PEP de *A. niger*

SEQ ID NO: 11: Secuencia de aminoácidos de la endoproteasa específica para prolina (PEP) BC2G076 de *Aspergillus aculeatus* con secuencia señal de pectinametilesterasa de *A. niger* y prosecuencia de PEP de *A. niger*

SEQ ID NO: 12: Secuencia de aminoácidos de la endoproteasa específica para prolina de *Rasamsonia emersonii*

35 SEQ ID NO: 13: Secuencia de ácido nucleico de la endoproteasa específica para prolina (PEP) BC2G075 de *Aspergillus carbonarius* con secuencia señal de pectinametilesterasa de *A. niger* y prosecuencia de PEP de *A. niger*

SEQ ID NO: 14: Secuencia de ácido nucleico de la endoproteasa específica para prolina (PEP) BC2G077 de *Aspergillus flavus* con secuencia señal de pectinametilesterasa de *A. niger* y prosecuencia de PEP de *A. niger*

40 SEQ ID NO: 15: Secuencia de ácido nucleico de la endoproteasa específica para prolina (PEP) BC2G076_ de *Aspergillus aculeatus* con secuencia señal de pectinametilesterasa de *A. niger* y prosecuencia de PEP de *A. niger*

SEQ ID NO: 16: Secuencia de ácido nucleico de la endoproteasa específica para prolina de *Rasamsonia emersonii*

Descripción detallada

45 En un aspecto, la presente descripción se refiere a un polipéptido que tiene actividad de endoproteasa específica para prolina, en donde el polipéptido tiene menos de 70 % de actividad residual con el uso de acetil-AlaAlaPro-paranitroanilina (Ac-AAP-pNA) como sustrato después de que el polipéptido se ha mantenido a una temperatura de 65 °C durante 15 min. La actividad de endoproteasa específica para prolina residual se mide mediante el uso de

acetil-AlaAlaPro-paranitroanilina (Ac-AAp-pNA) a pH 4,5, por ejemplo, en un tampón de acetato de sodio a pH 4,5 a 20 grados Celsius. De manera sorprendente, un polipéptido que tiene menos de 55 % de actividad residual después de que el polipéptido se ha mantenido a una temperatura de 65 °C durante 15 min, se puede usar de manera ventajosa en aplicaciones tales como en alimentos o piensos, en donde se desea escasa o nula actividad residual.

- 5 Preferiblemente, un polipéptido proporcionado por la invención tiene menos de 70%, 60 %, 55 %, 50 %, 45 %, 40 %, 30 %, 20 %, 15 %, 10 %, tal como menos de 5 % de actividad residual después de que el polipéptido se ha mantenido a una temperatura de 65 °C durante 15 min. Según se define en la presente memoria, menos de 70%, 60 %, 55 %, o menos de 50 %, o menos de 45 %, 40 %, 30 %, 20 %, 15 %, 10 % o 5 % de actividad residual significa que el polipéptido exhibe menos de 55 % o menos de 50 %, o menos de 45 %, 40 %, 30 %, 20 %, 15 %, 10 % o 5 %, respectivamente, de actividad en comparación con la actividad del polipéptido antes de mantener al polipéptido a 65 °C durante 15 min. Preferiblemente, un polipéptido según la presente invención no exhibe ninguna actividad residual después de que el polipéptido se ha mantenido a una temperatura de 65 °C durante 15 min.

En una realización, un polipéptido según se describe en la presente memoria es un polipéptido que tiene actividad de endoproteasa específica para prolina, en donde el polipéptido tiene menos de 90 % de actividad residual con el uso de acetil-AlaAlaPro-paranitroanilina (Ac-AAp-pNA) como sustrato después de que el polipéptido se ha mantenido a una temperatura de 60 °C durante 15 min.

- 15 La actividad de endoproteasa específica para prolina residual se mide mediante el uso de acetil-AlaAlaPro-paranitroanilina (Ac-AAp-pNA) a pH 4,5, por ejemplo, en un tampón de acetato de sodio a pH 4,5 a 20 grados Celsius. De manera sorprendente, un polipéptido que tiene menos de 90 % de actividad residual después de que el polipéptido se ha mantenido a una temperatura de 60 °C durante 15 min, se puede usar de manera ventajosa en aplicaciones tales como en alimentos o piensos, en donde se desea escasa o nula actividad residual. Preferiblemente, un polipéptido proporcionado en la presente memoria tiene menos de 85 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 15 %, 10 %, tal como menos de 5 % de actividad residual después de que el polipéptido se ha mantenido a una temperatura de 60 °C durante 15 min. Según se define en la presente memoria, menos de 90 %, 85 %, 80 %, 70 %, o menos de 60 %, 50 %, 45 %, 40 %, 30 %, 20 %, 15 %, 10 % o 5 % de actividad residual significa que el polipéptido exhibe menos de 70 %, 60 %, 50 %, o menos de 40 %, 30 %, 20 %, 15 %, 10 % o 5 %, respectivamente, de actividad en comparación con la actividad del polipéptido antes de mantener al polipéptido a 60 °C durante 15 min. Preferiblemente, un polipéptido según la presente invención no exhibe ninguna actividad residual después de que el polipéptido se ha mantenido a una temperatura de 60 °C durante 15 min.

- 20 30 La invención también proporciona un polipéptido que tiene actividad de endoproteasa específica para prolina, opcionalmente que tiene menos de 70 % de actividad residual con el uso de acetil-AlaAlaPro-paranitroanilina (Ac-AAp-pNA) como sustrato después de que el polipéptido se ha mantenido a una temperatura de 65 °C durante 15 min, u opcionalmente que tiene menos de 90 % de actividad residual con el uso de acetil-AlaAlaPro-paranitroanilina (Ac-AAp-pNA) como sustrato después de que el polipéptido se ha mantenido a una temperatura de 60 °C durante 15 min, en donde el polipéptido se selecciona del grupo que consiste en:

25 i. un polipéptido, que, cuando se alinea con una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 1 comprende una sustitución de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 469, y opcionalmente al menos una sustitución de aminoácido adicional en la posición 204, 304, 377, 466 y/o 477, en donde la posición se define con respecto a la SEQ ID NO: 1;

- 30 ii. un polipéptido, que, cuando se alinea con una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 1 comprende un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala (A), Cys (C), Asp (D), Glu (E), Phe (F), Gly (G), His (H), Ile (I), Lys (K), Leu (L), Met (M), Asn (N), Gln (Q), Arg (R), Ser (S), Thr (T), Val (V), Trp (W) y Tyr (Y) en una posición correspondiente a la posición 469, y opcionalmente un aminoácido de Phe (F) en la posición 204, Ser (S) en la posición 304, Ala (A) en la posición 377, Thr (T) en la posición 466 y/o Ala (A) en la posición 477, en donde la posición se define con respecto a la SEQ ID NO: 1;

35 iii. un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 1, en donde la SEQ ID NO: 1 comprende al menos una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en P469A, P469C, P469D, P469E, P469F, P469G, P469H, P469I, P469K, P469L, P469M, P469N, P469Q, P469R, P469S, P469T, P469V, P469W y P469Y, y opcionalmente una sustitución de aminoácido I204F, P304S, P377A, P466T y/o P477A, en donde las sustituciones de aminoácidos se definen con respecto a la SEQ ID NO: 1;

40 iv. un polipéptido según i) a iii), pero que carece de una secuencia señal y/o una secuencia proproteína;

45 v. un polipéptido según i) a iv), en donde el polipéptido tiene al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 1;

50 vi. un polipéptido codificado por un ácido nucleico que tiene al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con respecto a la SEQ ID NO: 2, o con respecto a una secuencia codificante madura de la SEQ ID NO: 2, en donde la SEQ ID NO: 2 comprende al menos una mutación que codifica al menos una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo P469A, P469C, P469D, P469E, P469F, P469G, P469H, P469I, P469K, P469L, P469M, P469N, P469Q, P469R, P469S, P469T, P469V, P469W y P469Y, y opcionalmente una sustitución

de aminoácido I204F, P304S, P377A P466T y/o P477A, en donde las sustituciones de aminoácidos se definen con respecto a la SEQ ID NO: 1.

5 Según se usa en la presente memoria, cuando un polipéptido se alinea con una secuencia de endoproteasa específica para prolina de la SEQ ID NO: 1, un polipéptido de la presente invención comprenderá al menos una sustitución en una posición correspondiente a 469 en la SEQ ID NO: 1.

10 Aquellas posiciones en un polipéptido de la invención, que puede ser un polipéptido recombinante, sintético o variante, que corresponden a las posiciones establecidas anteriormente en la SEQ ID NO: 1 se puede identificar al alinear la secuencia del polipéptido de la presente invención con la de la SEQ ID NO: 1 mediante el uso de, por ejemplo, la alineación mediante el programa Needle. Las posiciones en el polipéptido de la presente invención que corresponden a las posiciones en la SEQ ID NO: 1, según se establecieron anteriormente, se pueden identificar, por lo tanto, y se hace referencia a ellas como las posiciones definidas con respecto a la SEQ ID NO: 1.

La presente invención también proporciona un polipéptido que es un polipéptido aislado, sustancialmente puro, puro, recombinante, sintético o variante del polipéptido según se describe en la presente memoria.

15 De manera ventajosa, un polipéptido proporcionado por la invención comprende al menos un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala (A), Cys (C), Asp (D), Glu (E), Phe (F), Gly (G), His (H), Ile (I), Lys (K), Leu (L), Met (M), Asn (N), Gln (Q), Arg (R), Ser (S), Thr (T), Val (V), Trp (W) y Tyr (Y) en una posición correspondiente a la posición 469, en donde la posición se define con respecto a la SEQ ID NO:1.

20 En una realización, un polipéptido según se describe en la presente memoria comprende, además, un aminoácido de Phe (F) en la posición 204, Ser (S) en la posición 304, Ala (A) en la posición 377, Thr (T) en la posición 466 y/o Ala (A) en la posición 477, en donde la posición se define con respecto a la SEQ ID NO:1.

25 En una realización, la invención proporciona un polipéptido que tiene actividad de endoproteasa específica para prolina que comprende una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 1, en donde la SEQ ID NO: 1 comprende al menos una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en P469A, P469C, P469D, P469E, P469F, P469G, P469H, P469I, P469K, P469L, P469M, P469N, P469Q, P469R, P469S, P469T, P469V, P469W y P469Y, en donde las sustituciones de aminoácidos se definen con respecto a la SEQ ID NO: 1. En una realización adicional, un polipéptido que tiene actividad de endoproteasa específica para prolina comprende, además, una sustitución de aminoácido I204F, P304S, P377A, P466T y/o P477A. Preferiblemente, la invención proporciona un polipéptido que comprende al menos una sustitución(es) de aminoácido(s) que corresponde a la posición 469, y opcionalmente en la posición 204, 304, 377, 466 y/o 477, según se definieron anteriormente en la presente memoria,

30 que tiene al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 1. Por consiguiente, la presente invención proporciona un polipéptido que tiene al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 1 o con respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1, en donde la SEQ ID NO: 1 comprende una sustitución de aminoácido en la posición 469, y opcionalmente en la posición 204, 304, 377, 466 y/o 477, según se definieron anteriormente en la presente memoria.

35 En una realización, un polipéptido que tiene actividad de endoproteasa específica para prolina comprende las sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en P469D y I204F; P469D y P377A; P469Q y P477A; P469Y y P304S y P377A; P469Q y I204F y P466T; y P469Q y P466T y P477A.

40 Un polipéptido que tiene actividad de endoproteasa específica para prolina que, cuando se alinea con una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 1 comprende una sustitución de aminoácido correspondiente a la posición 469, según se definió anteriormente en la presente memoria, puede comprender sustituciones, eliminaciones e/o inserciones adicionales en una o más posiciones de aminoácido adicionales. Por ejemplo, un polipéptido según se describe en la presente memoria puede ser una variante del polipéptido o polipéptido maduro de la SEQ ID NO:1 que comprende una sustitución, eliminación o inserción en la posición 469, según se definió en la presente memoria, y tener adicionalmente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12, o más sustituciones, eliminaciones e/o inserciones adicionales de aminoácidos, por las cuales el polipéptido todavía tiene la actividad o función del polipéptido de la invención. El experto apreciará que estos cambios de aminoácidos menores en el polipéptido de la invención pueden estar presentes (por ejemplo, mutaciones de origen natural) o producirse (por ejemplo, usando tecnología de r-ADN) sin la pérdida de la función o actividad de la proteína. En el caso de que estas mutaciones estén presentes en un dominio de unión, sitio activo u otro dominio funcional del polipéptido, se puede cambiar una propiedad del polipéptido, pero el polipéptido puede mantener su actividad. En el caso de que una mutación esté presente y no esté cerca del sitio activo, dominio de unión u otro dominio funcional, se puede esperar un efecto menor.

55 También se pueden identificar equivalentes funcionales de un polipéptido según la invención, p. ej., al someter a barrido bibliotecas combinatorias de mutantes, p. ej., mutantes de truncamiento, del polipéptido de la invención para determinar la actividad biológica del polipéptido de la invención. En una realización, se genera una biblioteca heterogénea de variantes mediante mutagénesis combinatoria a nivel de ácido nucleico. Se puede producir una biblioteca heterogénea de variantes, por ejemplo, al ligar enzimáticamente una mezcla de oligonucleótidos sintéticos

con secuencias de gen de manera que un conjunto degenerado de posibles secuencias proteicas se pueda expresar como polipéptidos individuales, o alternativamente, como un conjunto de proteínas de fusión más grandes (p. ej., para visualización en fagos). Existe una variedad de métodos que se pueden usar para producir bibliotecas de posibles variantes de los polipéptidos de la invención a partir de una secuencia de oligonucleótidos degenerada. Los métodos para sintetizar oligonucleótidos degenerados se conocen en la técnica (véase, p. ej., Narang (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura et al. (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura et al. (1984) Science 198:1056; Ike et al. (1983) Nucleic Acid Res. 11:477). El término "secuencia de ácido nucleico degenerada" o "secuencia de (oligo)nucleótido degenerada" denota una secuencia de ácidos nucleicos que incluye uno o más codones degenerados (en comparación con una molécula de ácido nucleico de referencia que codifica un polipéptido). Los codones degenerados contienen tripletes de ácidos nucleicos diferentes, pero codifican el mismo residuo aminoacídico (es decir, los tripletes GAU y GAC codifican cada uno Asp). La degeneración del codón se refiere a la naturaleza del código genético que permite la variación de la secuencia de ácido nucleico sin afectar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificado. El experto conoce sobre la "preferencia codónica" que exhibe una célula hospedante específica en el uso de codones de ácido nucleico para especificar un aminoácido dado.

Además, se pueden usar bibliotecas de fragmentos de la secuencia codificante de un polipéptido de la invención para generar una población heterogénea de polipéptidos para someter a barrido una selección posterior de variantes. Por ejemplo, se puede generar una biblioteca de fragmentos de la secuencia codificante al tratar un fragmento de PCR bicatenario de la secuencia codificante de interés con una nucleasa en condiciones en donde el mellado se produce solo aproximadamente una vez por molécula, desnaturalizar el ADN bicatenario, renaturalizar el ADN para formar un ADN bicatenario que puede incluir pares codificantes/no codificantes de productos mellados diferentes, retirar porciones monocatenarias de las estructuras dobles reformadas mediante tratamiento con S1 nucleasa y ligar la biblioteca de fragmentos resultante con un vector de expresión. Mediante este método, se puede derivar una biblioteca de expresión que codifica fragmentos del extremo N e internos de diversos tamaños de la proteína de interés.

En la técnica, se conocen diversas técnicas para barrer productos génicos de bibliotecas combinatorias creadas por mutaciones de truncamiento puntuales y para barrer bibliotecas de ADNc para productos génicos que tienen una propiedad seleccionada. Las técnicas más ampliamente usadas, que son adecuadas para análisis de alto rendimiento, para barrer grandes bibliotecas de genes típicamente incluyen clonar la biblioteca de genes en vectores de expresión, transformar células adecuadas con la biblioteca de vectores resultante y expresar los genes combinatorios en condiciones en las que la detección de una actividad deseada facilita el aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto se detectó. Se puede usar mutagénesis de conjunto recursivo (REM, por sus siglas en inglés), una técnica que potencia la frecuencia de mutantes funcionales en las bibliotecas, en combinación con los ensayos de barrido para identificar variantes de una proteína de la invención (Arkin and Yourvan (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7811-7815; Delgrave et al. (1993) Protein Engineering 6(3): 327-331).

Un polipéptido proporcionado por la invención puede carecer de una secuencia señal y/o una secuencia proproteína. Por ejemplo, un polipéptido como se proporciona en la presente memoria puede ser un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 1 que comprende una sustitución de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 469 y que carece de los primeros 17 aminoácidos que codifican una secuencia señal y/o que carece de los siguientes 19 aminoácidos que codifican una prosecuencia. Por consiguiente, un polipéptido proporcionado por la invención puede comprender un polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1, tal como los aminoácidos 37 a 521 de la SEQ ID NO: 1 y que comprende una sustitución de aminoácido en una posición correspondiente a la posición 469, y opcionalmente en la posición 204, 304, 377, 466 y/o 477 según se definieron en la presente memoria, en donde en aminoácido metionina en la posición 1 en la SEQ ID NO: 1 se cuenta como el número 1.

Un polipéptido proporcionado por la invención se puede codificar mediante cualquier ácido nucleico adecuado, tal como un ácido nucleico que tiene al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con respecto al ácido nucleico según la SEQ ID NO: 2, o con respecto a una secuencia codificante madura de la SEQ ID NO: 2, en donde la SEQ ID NO: 2 comprende al menos una mutación que codifica al menos una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo P469A, P469C, P469D, P469E, P469F, P469G, P469H, P469I, P469K, P469L, P469M, P469N, P469Q, P469R, P469S, P469T, P469V, P469W y P469Y, una sustitución de aminoácido I204F, P304S, P377A, P466T y/o P477A, en donde las sustituciones de aminoácidos se definen con respecto a la SEQ ID NO: 1.

En una realización, un polipéptido según se describe en la presente memoria se puede codificar mediante un ácido nucleico que tiene al menos 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o 100 % de identidad con respecto al ácido nucleico según la SEQ ID NO: 2, o con respecto a una secuencia codificante madura de la SEQ ID NO: 2, en donde la SEQ ID NO: 2 comprende mutaciones que codifican un polipéptido que tiene actividad de endoproteasa específica para prolina que comprende las sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en P469D y I204F; P469D y P377A; P469Q y P477A; P469Y y P304S y P377A; P469Q y I204F y P466T; y P469Q y P466T y P477A.

Típicamente, una secuencia polinucleotídica según se describe en la presente memoria está optimizada por codón, o es una secuencia optimizada por un par de codones para la expresión óptima de un polipéptido según se describe en la presente memoria en una célula hospedante particular.

5 En una realización, la presente invención incluye un fragmento biológicamente activo de un polipéptido según se describe en la presente memoria.

Los fragmentos biológicamente activos de un polipéptido de la invención incluyen polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente idénticas a o derivadas de la secuencia de aminoácidos de la proteína endoproteasa específica para prolina (p. ej., la secuencia de aminoácidos madura de SEQ ID NO:1), que incluyen menos aminoácidos que la proteína de longitud completa, pero que exhiben al menos una actividad biológica de la correspondiente proteína de longitud completa. Típicamente, los fragmentos biológicamente activos comprenden un dominio o motivo con al menos una actividad de la proteína endoproteasa específica para prolina. Un fragmento biológicamente activo puede comprender, por ejemplo, un dominio catalítico. Un fragmento biológicamente activo de una proteína de la invención puede ser un polipéptido que tiene, por ejemplo, 10, 25, 50, 100 o más aminoácidos de longitud. Además, se pueden preparar otras porciones biológicamente activas, en las que se eliminan otras regiones de la proteína mediante técnicas recombinantes y se evalúan para determinar una o más de las actividades biológicas de la forma natural de un polipéptido de la invención.

10 La descripción también incluye fragmentos de ácido nucleico que codifican los fragmentos biológicamente activos mencionados anteriormente de la proteína endoproteasa específica para prolina.

20 Un polipéptido según la presente invención puede ser una proteína de fusión. Las técnicas para producir polipéptidos de fusión se conocen en la técnica e incluyen ligar las secuencias codificantes que codifican los polipéptidos de manera que están dentro del mismo marco. La expresión del polipéptido fusionado está bajo el control del(de los) mismo(s) promotor(es) y terminador. Los polipéptidos híbridos pueden comprender una combinación de secuencias polipeptídicas parciales o completas obtenidas de al menos dos polipéptidos diferentes en donde una o más pueden ser heterólogas con respecto a una célula hospedante. Dichos polipéptidos de fusión de al menos dos polipéptidos diferentes pueden comprender un dominio de unión de un polipéptido, enlazado funcionalmente con un dominio catalítico de un segundo polipéptido. Se describen ejemplos de polipéptidos de fusión y fusiones de secuencia señal, por ejemplo, en WO2010/121933, WO2013/007820 y WO2013/007821.

25 Un polipéptido según la presente invención puede derivar de cualquier célula eucariota adecuada. Una célula eucariota puede ser una célula de mamífero, insecto, planta, hongo o alga. La expresión "derivado/a" o "derivable de" con respecto al origen de un polipéptido según se describe en la presente memoria, significa que cuando se lleva a cabo una búsqueda BLAST con un polipéptido según la presente invención, el polipéptido según la presente invención puede ser derivable de una fuente natural, tal como una célula microbiana, de la cual un polipéptido endógeno exhibe el porcentaje de homología o identidad más alto con el polipéptido según se describe en la presente memoria.

30 35 Un polipéptido según la presente invención puede derivar de una célula fúngica filamentosa o de una célula fúngica filamentosa termófila. Las células fúngicas filamentosas preferidas pertenecen a una especie de un género *Acremonium*, *Aspergillus*, *Chrysosporium*, *Myceliophthora*, *Penicillium*, *Talaromyces*, *Rasamsonia*, *Thielavia*, *Fusarium* o *Trichoderma*, *Amorphotheca*, *Pseudocercosporaella*, *Trametes*, *Rhizomucor*, *Calcarisporiella*, *Thermomyces*, *Thermoascus*, *Cornyascus*, *Myricoccum*, *Scytalidium*, *Chaetomium*, *Paecilomyces*, *Corynascus*, *Malbranchea*, *Stilbella*, *Thermomyces*, *Dactylospores*, *Humicola*, *Chaetomium*, *Melanocarpus*, *Rhizomucor*, *Lentinula*, *Anaeromyces*, y lo más preferiblemente, pertenecen a una especie de *Aspergillus niger*, *Acremonium alabamense*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus sojae*, *Aspergillus fumigatus*, *Talaromyces emersonii*, *Rasamsonia emersonii*, *Aspergillus oryzae*, *Chrysosporium lucknowense*, *Fusarium oxysporum*, *Myceliophthora thermophila*, *Trichoderma reesei*, *Thielavia terrestris*, *Penicillium chrysogenum*, *Amorphotheca resinae*, *Aureobasidium pullulans*, *Pseudocercospora herpotrichoides*, *Trametes versicolor* 52J, *Rhizomucor pusillus*, *Calcarisporiella thermophila*, *Talaromyces thermophilus*, *Thermomyces lanuginosus*, *Thermoascus aurantiacus*, *Cornyascus thermophilus*, *Myricoccum thermophilum*, *Scytalidium thermophilum*, *Myceliophthora hinnulea*, *Chaetomium thermophilum*, *Paecilomyces byssochlamydoides*, *Corynascus sepedonium*, *Malbranchea cinnamomea*, *Thielavia australiensis*, *Stilbella thermophila*, *Thermomyces stellatus*, *Talaromyces emersonii*, *Dactylospores thermophilus*, *Humicola hyalothermophilia*, *Acremonium thermophilum*, *Chaetomium olivicolor*, *Melanocarpus albomyces*, *Rhizomucor miehei*, *Lentinula edodes* o *Anaeromyces mucronatus*. Un polipéptido según la presente invención puede derivar de *Aspergillus niger*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus carbonarius* o *Rasamsonia emersonii*.

40 45 50 55 Un polipéptido según la presente invención puede ser un polipéptido de origen natural o un polipéptido genéticamente modificado o recombinante.

55 Un polipéptido según se describe en la presente memoria puede estar purificado. La purificación de proteínas es conocida para un experto en la técnica. Un método conocido para la purificación de proteínas es la cromatografía líquida de alto rendimiento.

Los polipéptidos según la presente invención pueden tener de manera ventajosa una propiedad mejorada. Una propiedad mejorada puede ser una actividad específica mejorada y/o una sensibilidad a temperatura aumentada en comparación con un polipéptido que no comprende una sustitución de aminoácido según se define en la presente memoria, o cualquier otra propiedad mejorada, por ejemplo, deseable en el procesamiento de un alimento o pienso.

5 De manera ventajosa, un polipéptido según se describe en la presente memoria tiene menos de 70 % de actividad residual sobre acetil-AlaAlaPro-paranitroanilina (Ac-AAp-pNA) como sustrato cuando el polipéptido se ha mantenido a una temperatura de 65 °C durante 15 min.

Los polipéptidos de la invención se pueden obtener mediante diversos procedimientos conocidos para un experto en la técnica, tales como:

10 1. PCR propensa a error para introducir mutaciones aleatorias y posteriormente un barrido de los polipéptidos (variantes) obtenidos y aislamiento de polipéptido(s) (variante(s)) con propiedades mejoradas

2. Redistribución por familia de variantes relacionadas de los genes que codifican el polipéptido según la invención y posteriormente un barrido de las variantes obtenidas y aislamiento de las variantes con propiedades mejoradas

15 Se pueden obtener variantes de genes que codifican un polipéptido de la presente invención que conducen a un nivel aumentado de ARNm y/o proteína, que resultan en mayor actividad, al modificar las secuencias polinucleotídicas de dichos genes. Entre dichas modificaciones se incluyen:

1. Mejorar el uso de codones de tal manera que los codones estén (óptimamente) adaptados al hospedante microbiano genitor.

20 2. Mejorar el uso de pares de codones de tal manera que los codones estén (óptimamente) adaptados al hospedante microbiano genitor.

3. Adición de secuencias estabilizantes a la información genómica que codifica un polipéptido según la invención que resulta en moléculas de ARNm con una semivida aumentada

25 Se describen métodos para aislar variantes con propiedades catalíticas mejoradas o niveles aumentados de ARNm o proteína en WO03/010183 y WO03/01311. Se describen métodos para optimizar el uso de codones en cepas microbianas genitoras, por ejemplo, en WO2008/000632. Se describen métodos para la adición de elementos estabilizantes en los genes que codifican el polipéptido de la invención en WO2005/059149.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona un método para generar un polipéptido variante, en donde el método comprende

30 i. seleccionar un polipéptido genitor que comprende al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 1, o con respecto a un polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1; y,

35 ii. sustituir al menos un aminoácido en una posición correspondiente a la posición 469, cuando se define con respecto a la SEQ ID NO: 1, por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala (A), Cys (C), Asp (D), Glu (E), Phe (F), Gly (G), His (H), Ile (I), Lys (K), Leu (L), Met (M), Asn (N), Gln (Q), Arg (R), Ser (S), Thr (T), Val (V), Trp (W) y Tyr (Y), y opcionalmente sustituir un aminoácido en la posición 204 por Phe (F), en la posición 304 por Ser (S), en la posición 377 por Ala (A), en la posición 466 por Thr (T) y/o en la posición 477 por Ala (A); y

3. generar el polipéptido variante,

en donde, opcionalmente, el polipéptido variante tiene menos de 70 % de actividad residual con el uso de Ac-AAp-pNA como sustrato después de que el polipéptido se ha mantenido a una temperatura de 65 °C durante 15 min.

40 Generar un polipéptido variante según se describe en la presente memoria puede incluir expresar un gen que codifica el polipéptido variante en una célula hospedante adecuada (recombinante) y cultivar la célula hospedante para generar el polipéptido variante.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende un polipéptido según se describe en la presente memoria.

45 Una composición según se describe en la presente memoria puede comprender un vehículo, un excipiente, una enzima auxiliar u otros compuestos. Típicamente, una composición o una formulación comprende un compuesto con el cual se puede formar una endoproteasa específica para prolina. Un excipiente, según se usa en la presente memoria, es una sustancia inactiva formulada junto con un polipéptido según se describe en la presente memoria, por ejemplo, sacarosa o lactosa, glicerol, sorbitol o cloruro de sodio. Una composición que comprende un polipéptido

50 según se describe en la presente memoria puede ser una composición líquida o una composición sólida. Una composición líquida normalmente comprende agua. Cuando se formula como una composición líquida, la

composición normalmente comprende componentes que bajan la actividad del agua, tal como glicerol, sorbitol o cloruro de sodio (NaCl). Una composición sólida que comprende un polipéptido según se describe en la presente memoria puede comprender un granulado que comprende la enzima o la composición comprende un polipéptido encapsulado en matrices líquidas como liposomas o geles como alginato o carragenanos. Existen muchas técnicas conocidas en la técnica para encapsular o granular un polipéptido o enzima (véase, por ejemplo, G.M.H. Meesters, "Encapsulation of Enzymes and Peptides", Capítulo 9, en N.J. Zuidam and V.A. Nedović (eds.) "Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and food processing" 2010). Una composición según se describe en la presente memoria puede comprender también un vehículo que comprende un polipéptido según se describe en la presente memoria. Un polipéptido según se describe en la presente memoria se puede unir o inmovilizar en un vehículo mediante tecnologías conocidas en la técnica.

La presente descripción también se refiere a un proceso para preparar una composición que comprende un polipéptido según se describe en la presente memoria, que puede comprender secar por pulverización un medio de fermentación que comprende el polipéptido, o granular, o encapsular un polipéptido según se describe en la presente memoria, y preparar la composición.

15 La presente descripción también se refiere a un envase, tal como una lata, un barril o un tonel que comprende un polipéptido o una composición que comprende un polipéptido según se describe en la presente memoria.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico que codifica una endoproteasa específica para prolina, que tiene al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad secuencial con respecto a la SEQ ID NO: 2, o con respecto a una secuencia codificante madura de la SEQ ID NO: 2, en donde la SEQ ID NO: 2 comprende al menos una mutación que codifica al menos una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en P469A, P469C, P469D, P469E, P469F, P469G, P469H, P469I, P469K, P469L, P469M, P469N, P469Q, P469R, P469S, P469T, P469V, P469W, P469Y, y opcionalmente en donde la SEQ ID NO: 2 comprende al menos una mutación adicional que codifica una sustitución de aminoácido I204F, P304S, P377A, P466T y/o P477A, en donde las sustituciones de aminoácidos se definen con respecto a la SEQ ID NO: 1.

25 En otra realización, una molécula de ácido nucleico aislada de la invención comprende una molécula de ácido nucleico que es el complemento inverso de la secuencia nucleotídica que se muestra en la SEQ ID NO: 2, o el complemento inverso de la secuencia codificante madura de la SEQ ID NO: 2, que comprende al menos una mutación que codifica al menos una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en P469A, P469C, P469D, P469E, P469F, P469G, P469H, P469I, P469K, P469L, P469M, P469N, P469Q, P469R, P469S, P469T, P469V, P469W y P469Y, y opcionalmente en donde la SEQ ID NO: 2 comprende al menos una mutación adicional que codifica una sustitución de aminoácido I204F, P304S, P377A, P466T y/o P477A, en donde las sustituciones de aminoácidos se definen con respecto a la SEQ ID NO: 1, o una variante de cualquiera de dicha secuencia nucleotídica.

35 También se describe un ácido nucleico que se hibrida en condiciones de rigurosidad media, preferiblemente, en condiciones de rigurosidad alta con la cadena complementaria de la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2, que comprende al menos una mutación que codifica al menos una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo P469A, P469C, P469D, P469E, P469F, P469G, P469H, P469I, P469K, P469L, P469M, P469N, P469Q, P469R, P469S, P469T, P469V, P469W y P469Y, y opcionalmente en donde la SEQ ID NO: 2 comprende al menos una mutación adicional que codifica una sustitución de aminoácido I204F, P304S, P377A, P466T y/o P477A, en donde las sustituciones de aminoácidos se definen con respecto a la SEQ ID NO: 1.

40 Una molécula de ácido nucleico que es complementaria a otra secuencia nucleotídica es una que es suficientemente complementaria a la otra secuencia nucleotídica para que pueda hibridarse con la otra secuencia nucleotídica y formar así una estructura doble estable. El término "ADNc" (ADN complementario) se define en la presente memoria como una molécula de ADN que se puede preparar mediante transcripción inversa a partir de una molécula de ARNm. En procariotas, la molécula de ARNm se obtiene a partir de la transcripción del ADN genómico de un gen presente en una célula. En células eucariotas, los genes contienen ambos exones, es decir, secuencias codificantes e intrones, es decir, secuencias intercaladas ubicadas entre los exones. Por lo tanto, en células eucariotas, el ARN primario, inicial obtenido a partir de la transcripción del ADN genómico de un gen se procesa a través de una serie de etapas antes de aparecer como ARNm. Estas etapas incluyen la eliminación de las secuencias intrónicas mediante un proceso denominado empalme. El ADNc derivado de ARNm solo contiene secuencias codificantes y se puede traducir directamente en el producto polipeptídico correspondiente.

45 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende un polinucleótido según se describe en la presente memoria enlazado funcionalmente con al menos una secuencia de control que dirige la expresión del polipéptido en una célula hospedante para expresión.

55 Existen diversos modos de insertar un ácido nucleico en una construcción de ácido nucleico o un vector de expresión que son conocidos para un experto en la técnica, véase por ejemplo Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3a Ed., CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001. Puede ser deseable manipular

un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la presente invención con secuencias de control, tal como secuencias promotoras y terminadoras.

Un promotor puede ser cualquier secuencia promotora apropiada adecuada para una célula hospedante eucariota o procariota, que exhibe actividad de transcripción, incluidos promotores mutantes, truncados e híbridos, y se puede obtener a partir de polinucleótidos que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares ya sean endógenos (natural) o heterólogos (extraños) con respecto a la célula. El promotor puede ser un promotor constitutivo o inducible. Preferiblemente, el promotor es un promotor inducible, por ejemplo, un promotor inducible por almidón. Los promotores adecuados en hongos filamentosos son promotores que se pueden seleccionar del grupo que incluye, pero no se limita a, promotores obtenidos a partir de polinucleótidos que codifican TAKA amilasa de *A. oryzae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, promotor gdpA de *Aspergillus*, alfa-amilasa neutra de *A. niger*, alfa-amilasa estable en ácido de *A. niger*, glucoamilasa (glaA) de *A. niger* o *A. awamori*, endoxilanasa (xlnA) o beta-xilosidasa (xlnD) de *A. niger* o *A. awamori*, cellobiohidrolasa I (CBHI) de *T. reesei*, lipasa de *R. miehei*, proteasa alcalina de *A. oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *A. oryzae*, acetamidasa de *A. nidulans*, camiloglucosidasa de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), Dania de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), Quinn de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), proteasa similar a tripsina de *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, cellobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, cellobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa I de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa IV de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, xilanasa I de *Trichoderma reesei*, xilanasa II de *Trichoderma reesei*, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei*, así como el promotor NA2-tpi (un híbrido de los promotores de los polinucleótidos que codifican la alfa-amilasa neutra de *A. niger* y la triosa fosfato isomerasa de *A. oryzae*), y promotores mutantes, truncados e híbridos de estos.

Se puede usar cualquier terminador que es funcional en una célula según se describe en la presente memoria, que son conocidos para un experto en la técnica. Los ejemplos de secuencias terminadoras adecuadas en hongos filamentosos incluyen secuencias terminadoras de un gen fúngico filamento, tal como de genes de *Aspergillus*, por ejemplo, del gen de TAKA amilasa de *A. oryzae*, los genes que codifican glucoamilasa (glaA) de *A. niger*, antranilato sintasa de *A. nidulans*, alfa-glucosidasa de *A. niger*, trpC y/o proteasa similar a tripsina de *Fusarium oxysporum*.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una célula hospedante que comprende una construcción de ácido nucleico o un vector de expresión según se describen en la presente memoria. Una célula hospedante adecuada puede ser una célula de mamífero, insecto, planta, hongo o alga, o una célula bacteriana. Una célula hospedante adecuada puede ser una célula fúngica, por ejemplo, del género *Acremonium*, *Aspergillus*, *Chrysosporium*, *Fusarium*, *Myceliophthora*, *Penicillium*, *Rasamsonia*, *Talaromyces*, *Thielavia*, *Trichoderma*, *Saccaromyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, por ejemplo, *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *A. oryzae*, *A. sojae*, *Talaromyces emersonii*, *Rasamsonia emersonii* *Chrysosporium lucknowense*, *Fusarium oxysporum*, *Myceliophthora thermophila*, *Thielavia terrestris* o *Trichoderma reesei* o *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia pastoris*

Una célula hospedante puede ser una célula hospedante recombinante o transgénica. La célula hospedante se puede modificar genéticamente con una construcción de ácido nucleico o vector de expresión según se describen en la presente memoria, con técnicas estándares conocidas en la técnica, tales como electroporación, transformación de protoplasto o conjugación, por ejemplo, según se describe en Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3^a Ed., CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001. Un hospedante recombinante puede sobreexpresar un polipéptido según la presente descripción mediante técnicas conocidas en la técnica.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un proceso para la producción de un polipéptido según se describe en la presente memoria, que comprende cultivar una célula hospedante recombinante en un medio de fermentación adecuado en condiciones que conducen a la producción del polipéptido y producir el polipéptido. Un experto en la técnica entiende cómo llevar a cabo un proceso para la producción de un polipéptido según se describe en la presente memoria dependiendo de la célula hospedante usada, tal como el pH, la temperatura y la composición de un medio de fermentación. Las células hospedantes se pueden cultivar en matraces de agitación o en fermentadores que tienen un volumen de 0,5 o 1 litro o mayor hasta 10 a 100 o más metros cúbicos. El cultivo se puede llevar a cabo de manera aerobia o anaerobia, dependiendo de los requisitos de una célula hospedante.

De manera ventajosa, un polipéptido según se describe en la presente memoria se recupera o aisla del medio de fermentación. Recuperar o aislar un polipéptido de un medio de fermentación se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante centrifugación, filtración y/o ultrafiltración.

Un polipéptido que tiene actividad de endoproteasa específica para prolina o una composición que comprende un polipéptido según se describe en la presente memoria se puede usar en una gran variedad de aplicaciones, por ejemplo, en la producción de un producto alimentario o pienso, tal como en la producción de un hidrolizado proteico.

Diversas proteínas alimentarias contienen subfracciones altamente alergénicas que incluso pueden ser tóxicas para individuos específicos, tales como gluten que contiene prolaminas con secuencias peptídicas ricas en prolina. Estas proteínas se pueden someter a la nueva enzima para aliviar su antigenicidad o toxicidad.

Un grupo de personas para las cuales el gluten es tóxico son los individuales que padecen celiaquía. La celiaquía, también conocida como enfermedad celíaca, es una enfermedad autoinmunitaria del intestino delgado causada por la ingesta de proteínas de gluten de cereales, tales como alfa-gliadina del trigo, hordeína de la cebada, secalina del centeno y avenina de la avena.

5 Por consiguiente, un polipéptido que tiene actividad de endoproteasa específica para prolina o una composición que comprende un polipéptido según se describe en la presente memoria se puede usar en la preparación de un suplemento alimentario o como un medicamento en el tratamiento de un paciente que padece celiaquía, o en el tratamiento de personas intolerantes al gluten.

10 Un polipéptido según se describe en la presente memoria también se puede usar como un auxiliar de procesamiento para hidrolizar el gluten en un producto alimentario.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un proceso para la preparación de un producto alimentario o pienso que comprende incubar una forma intermediaria de un producto alimentario o pienso con un polipéptido o una composición que comprende un polipéptido según se describe en la presente memoria, y preparar el producto alimentario o pienso. Un producto alimentario en un proceso según se describe en la presente memoria incluye una bebida, tal como cerveza, vino o jugo de fruta, o un producto horneado, o un producto lácteo, pero no se limita a estos.

Un producto alimentario y/o una forma intermediaria de un producto alimentario puede comprender gluten.

Se halló que un polipéptido que tiene actividad de endoproteasa específica para prolina según se describe en la presente memoria fue capaz de hidrolizar los epítotos tóxicos en el gluten en fragmentos no tóxicos.

20 Una forma intermediaria de un producto alimentario puede ser cualquier forma adecuada de un producto alimentario durante la preparación del producto alimentario. Por ejemplo, una forma intermediaria de cerveza puede ser un mosto y una forma intermediaria de pan puede ser una masa o una mezcla.

25 Un proceso para la preparación de un producto alimentario según la presente descripción puede comprender una etapa de pasteurizar el producto alimentario. La pasteurización normalmente comprende calentar un producto alimentario, o una forma intermediaria de un producto alimentario, por ejemplo, al llevar el producto alimentario o forma intermediaria de un producto alimentario hasta una temperatura de entre 60 a 68 °C entre 10 a 20 min, o entre 12 y 18 min, o hasta una temperatura de entre 70-74 °C, tal como aproximadamente 72 °C durante al menos 5, 10 o 15 segundos.

30 Un producto alimentario en un proceso según se describe en la presente memoria puede ser también un hidrolizado proteico. Por consiguiente, la presente descripción se refiere a un proceso para la preparación de un hidrolizado proteico que comprende poner en contacto un sustrato proteico con un polipéptido o una composición, según se describen en la presente memoria, y producir el hidrolizado proteico. Un hidrolizado proteico se puede preparar a partir de cualquier sustrato proteico adecuado, por ejemplo, un sustrato proteico que es rico en residuos prolina, tal como gluten en cereales o caseínas en leche bovina.

35 En un aspecto, la presente descripción se refiere a un producto alimentario obtenible mediante un proceso para la preparación de un producto alimentario según se describe en la presente memoria.

Ejemplos

Materiales y métodos

40 Se llevaron a cabo procedimientos de ADN estándares según se describen en Sambrook & Russell, 2001, Molecular cloning: a laboratory manual, 3^a Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, a menos que se indique lo contrario. Las secuencias de ADN se ordenaron en DNA 2.0.

Ejemplo 1. Clonación, expresión y recuperación de endoproteasa específica para prolina (PEP) (mutante)

Ejemplo 1.1. Clonación y expresión

45 La secuencia proteica de la endoproteasa específica para prolina (PEP) de *A. niger* se muestra en la SEQ ID NO: 1, en donde los primeros 17 aminoácidos son una secuencia señal de pectinametilesterasa de *A. niger* (PMeA ss; SEQ ID NO: 2) y la parte siguiente comprende 19 aminoácidos de la prosecuencia de endoproteasa específica para prolina de *A. niger* (SEQ ID NO: 4).

50 Se diseña una secuencia de ADN adaptada con codones para la expresión de esta proteína en *Aspergillus niger* que contiene sitios de restricción adicionales para la subclonación en un vector de expresión de *Aspergillus*. La adaptación con codones se llevó a cabo según se describe en WO 2008/000632. La secuencia de ADN optimizada con codones para *A. niger* del gen que codifica la proteína PEP de la SEQ ID: NO: 1 se muestra en la SEQ ID NO: 2.

De un modo similar, la endoproteasa específica para prolina mutante de la SEQ ID NO: 1 que se indica en la Tabla 1, Tabla 2 y en la Tabla 3 se optimizaron con codón para la expresión en *Aspergillus niger*.

Asimismo, las endoproteasas específicas para prolina de *A. flavus*, *A. aculeatus* y *Rasamsonia emersonii* que se muestran en las SEQ ID NO: 10-12 y que comprenden una sustitución P469L en una posición homóloga con respecto a la SEQ ID NO: 1, se optimizaron con codón para la expresión en *A. niger*, lo que resultó en las secuencias de ácido nucleico de las SEQ ID NO: 14-16, respectivamente.

La secuencia de iniciación de la traducción del promotor de glucoamilasa *glaA* se modificó en 5'-CACCGTCAAA ATG-3' y se usó una secuencia de terminación de la traducción óptima 5'-TAAA-3' en la generación de la construcción para expresión (según se detalla también en WO2006/077258). Un fragmento de ADN que contenía a.o. parte del promotor de glucoamilasa y el gen codificante de PEP se sintetizó completamente, se purificó y digirió con EcoRI y Pael. El vector pGBTOP-16 (Figura 1) se linealizó mediante digestión con EcoRI/Pael y el fragmento de vector linealizado posteriormente se purificó mediante extracción en gel. El fragmento de ADN que contenía la región codificante de PEP se clonó en el vector pGBTOP-16 que resultó en pGBTOP-PEP. Posteriormente, se transformó GBA 306 de *A. niger* (cepa $\Delta g\text{laA}$, $\Delta p\text{epA}$, $\Delta h\text{dfA}$, amplicón *Bam*H adaptado, $\Delta a\text{myBII}$, $\Delta a\text{myBI}$, $\Delta a\text{myA}$ alfa-amilasa y glucoamilasa negativa) con el vector pGBTOP-PEP linealizado mediante digestión por *Not*I, en un protocolo de cotransformación con pGBAAS-4 linealizado, con cepa y métodos según se describen en WO 2011/009700 y las referencias en él, y se seleccionó en medios que contenían acetamida y se purificó la colonia según procedimientos estándares. La transformación y selección se llevan a cabo según se describe en WO 98/46772 y WO 99/32617. Las cepas que contenían el gen de PEP se seleccionaron a través de PCR con cebadores específicos para el gen de PEP para verificar la presencia del casete de expresión de pGBTOP-PEP. Los transformantes se seleccionaron y se replicaron en placas adicionalmente para obtener un inóculo de cepa único.

Ejemplo 1.2. Producción de PEP (mutante) en cepa PEP de *A. niger*

Para cada endoproteasa específica para prolina PEP (mutante) se prepararon esporas de PEP de *A. niger* nuevas. Se inocularon con 10^7 de esporas 4 matraces de agitación con 100 ml de medio de fermentación 1 (10 % p/v de sólidos de maíz fermentado, 1 % p/v de glucosa.H₂O, 0,1 % p/v de NaH₂PO₄.H₂O, 0,05 % p/v de MgSO₄.7H₂O, 0,025 % p/v Basildon, pH 5,8) en matraces de agitación de 500 ml con deflector. Estos precultivos se incubaron a 34 °C y 170 rpm durante 16-24 horas. De los precultivos, se usaron 50 ml para la inoculación de 1 matraz de agitación con 1 litro de medio de fermentación 2 (15 % p/v de maltosa, 6 % de p/v bacto-soitona, 1,5 % p/v de (NH₄)₂SO₄, 0,1 % p/v de NaH₂PO₄.H₂O, 0,1 % p/v de MgSO₄.7H₂O, 0,1 % p/v de L-arginina, 8 % p/v de Tween-80, 2 % p/v de Basildon, 2 % p/v de MES pH 5,1) en un tamaño de matraz de agitación de 5 litros y se agitó a 34 °C y 170 rpm. Después de 3, 4, 5 y 6 días de incubación, el pH del cultivo se redujo hasta pH 5,0 usando HCl 2 N y se analizaron muestras de cada uno de estos puntos de tiempo para determinar la actividad de PEP. Se tomaron muestras de 50 mL y el sobrenadante se separó de la biomasa mediante centrifugación y posteriormente filtración. La muestra con la actividad más alta se usó para caracterizar el mutante de PEP producido.

Ejemplo 2. Mediciones de la actividad de endoproteasa específica para prolina (PEP)

Se incubaron 100 µL de sobrenadante de cultivo según se produjo en el Ejemplo 1, diluidos en 0,1 M tampón de acetato de sodio a pH 4,5 con 50 mM de NaCl, con 100 µL de 6 mM Ac-AAP-pNA (acetil-AlaAlaPro-paranitroanilina de Selleckchem o CPC Scientific; pureza >95,0 % en base al análisis por HPLC) en 0,1 M tampón de NaAc a pH4,5 con 50 mM de NaCl, en una MTC (placa de microtitulación) Nunc de 96 pocillos con fondo plano. Después de 60 minutos a 20 °C, la reacción se detuvo mediante la adición de 40 µL de HCl 1 M. El pNA que se había liberado mediante PEP se midió en un espectrofotómetro Tecan MTP a 405 nm (A405) (www.tecan.com). El blanco se preparó al mezclar el sobrenadante de cultivo diluido con la disolución de sustrato que se había mezclado con la disolución de HCl de antemano. La actividad se expresa en pNASU. 1pNASU es la cantidad de enzima que se libera de Ac-AAP-pNA en 1 hora la cantidad de pNA que corresponde a un aumento en la absorción a 405 nm de 1 OD, usando las condiciones descritas anteriormente. La A405 no debería estar por debajo del valor blanco en el inicio de la reacción ni por encima de 2,5 al finalizar la reacción, ni puede la A405 exceder el rango lineal del espectrofotómetro que se usa.

Ejemplo 3. Estabilidad térmica de la endoproteasa específica para prolina

Para evaluar la estabilidad térmica de la PEP genitora y de los mutantes que se indican en la Tabla 1, antes del ensayo de actividad se procedió a una incubación de 100 µL de una dilución de diez veces del sobrenadante de cultivo producido en el Ejemplo 1 en tampón (0,1 M NaAc pH 4,5, con 50 mM de NaCl) a 55 °C y 65 °C durante 15 min en una placa de PCR en una máquina de PCR. Después de los 15 min de incubación, las muestras se enfriaron rápidamente hasta 25 °C en la máquina de PCR. Se midió el pNASU/mL de cada muestra. La actividad inicial medida antes de la incubación a temperatura elevada (0 minutos) se usó como referencia (100 %) para determinar la actividad residual. Todas las actividades se midieron cuatro veces.

La Tabla 1 muestra que todas las endoproteasas específicas para prolina que tienen una mutación en la posición 469 tienen una actividad residual significativamente reducida en comparación con la endoproteasa específica para prolina genitora después de mantener la enzima a 65 °C durante 15 min.

5 Tabla 1. Actividad residual de mutantes de endoproteasa específica para prolina en comparación con la endoproteasa específica para prolina genitora después de mantener a 55 °C y 65 °C durante 15 min.

		Actividad residual (pNASU) en el T indicado después de 15'		
Clon de PEP	Sustituciones con respecto a la SEQ ID NO genitora: 1	55 °C	60 °C	65 °C
PEP	Genitor	100 %	93 %	80 %
P469A	P469A	97 %	67 %	51 %
P469C	P469C	93 %	61 %	18 %
P469D	P469D	77 %	35 %	<2 %
P469E	P469E	99 %	72 %	30 %
P469F	P469F	72 %	37 %	<2 %
P469G	P469G	89 %	80 %	21 %
P469H	P469H	103 %	27 %	0 %
P469I	P469I	103 %	66 %	15 %
P469K	P469K	127 %	70 %	15 %
P469L	P469L	88 %	58 %	7 %
P469M	P469M	92 %	85 %	30 %
P469N	P469N	90 %	41 %	<2 %
P469Q	P469Q	84 %	78 %	33 %
P469R	P469R	100 %	59 %	13 %
P469S	P469S	104 %	63 %	25 %
P469T	P469T	84 %	65 %	11 %
P469V	P469V	92 %	80 %	21 %
P469W	P469W	72 %	47 %	<2 %
P469Y	P469Y	58 %	39 %	<2 %

Ejemplo 4. Termoestabilidad de endoproteasa específica para prolina que comprende una mutación en la posición P469 y una mutación adicional

Las mutaciones en la posición P469 contribuyen sustancialmente a reducir la termoestabilidad de la endoproteasa específica para prolina de *Aspergillus niger*. Se llevaron a cabo sustituciones de aminoácidos adicionales, es decir, I204F, P377A, P477A, P304S y P377A, P466T y I204F, y P466T y P477A, en la secuencia de la endoproteasa específica para prolina para investigar si se podría reducir adicionalmente la termoestabilidad de la endoproteasa específica para prolina de *A. niger*.

La clonación, expresión y recuperación de los mutantes se llevaron a cabo según se describe en el Ejemplo 1. La determinación de las actividades residuales se llevó a cabo según se describe en el Ejemplo 3. La Tabla 2 muestra la termoestabilidad de la endoproteasa específica para prolina genitora y la endoproteasa específica para prolina mutante que contiene una sustitución simple en la posición 204, 377 y 477.

Tabla 2. Actividad residual de la endoproteasa específica para prolina (PEP) genitora de *Aspergillus niger* y la PEP mutante que comprende una sustitución simple

		Actividad residual en el T indicado después de 15'		
Sustituciones con respecto a la SEQ ID NO 1 genitora		55 °C	60 °C	65 °C
PEP	Genitor	100 %	93 %	80 %
PEP4	I204F	83 %	58 %	8 %
PEP8	P377A	89 %	56 %	11 %
PEP10	P477A	86 %	37 %	1 %

15 Tabla 3. Actividad residual de mutantes de la endoproteasa específica para prolina de *Aspergillus niger* que comprenden una sustitución en la posición P469 y sustituciones adicionales

		Actividad residual en el T indicado después de 15'					
Sustituciones con respecto a la SEQ ID NO genitora: 1		60,4 °C	57,3 °C	52,5 °C	47,0 °C	42,4 °C	39,4 °C
PEP-5_18	P469D+I204F	0 %	0 %	4 %	64 %	99 %	100 %
PEP-5_57	P477A+P469Q	0 %	0 %	10 %	70 %	93 %	99 %
PEP-5_22	P469D+P377A	0 %	5 %	39 %	79 %	99 %	100 %
PEP-5_15	P377A+P304S+P469Y	0 %	5 %	37 %	82 %	100 %	99 %
PEP-5_73	P466T+P469Q+I204F	1 %	1 %	12 %	66 %	91 %	98 %
PEP-5_74	P466T+P469Q+P477A	0 %	0 %	3 %	46 %	80 %	96 %

Los resultados en la Tabla 3 muestran que la termoestabilidad de la endoproteasa específica para prolina que comprende una sustitución en la posición 469 se puede reducir adicionalmente mediante sustituciones en una o más posiciones de aminoácidos adicionales, sin perder la actividad enzimática a temperaturas más bajas.

5 Ejemplo 5. Estabilidad térmica de mutantes de endoproteasa específica para prolina homólogos

Para establecer si las mutaciones en la posición P469 en la endoproteasa específica para prolina de *Aspergillus niger* podrían ser más generalmente aplicables para reducir la termoestabilidad en una posición homóloga en otra endoproteasa específica para prolina, se introdujo una mutación en una posición homóloga a 469 de la SEQ ID NO: 1 en endoproteasas específicas para prolina derivadas de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus aculeatus* y *Rasamsonia emersonii*.

10 Para establecer la posición en las endoproteasas específicas para prolina que corresponde a la posición mutada en la endoproteasa específica para prolina de *Aspergillus niger* de referencia, se alinearon las secuencias. La alineación se muestra en la Figura 2 y los porcentajes de identidad se muestran en la Tabla 7. La identidad se determinó con NEEDLE usando el ajuste NOBRIEF. La identidad_más larga, es decir, incluida la preprosecuencia, se tomó como la medida de identidad entre dos secuencias.

15 Tabla 7. Identidad de secuencia de endoproteasas específicas para prolina homólogas derivadas de *A. carbonarius*, *A. flavus*, *A. aculeatus* y *Rasamsonia emersonii* con respecto a la endoproteasa específica para prolina de *A. niger*.

Origen de la endoproteasa específica para prolina	Secuencia de aminoácidos (incluida la preprosecuencia)	Identidad_más larga según se determinó por NEEDLE (NOBRIEF)
<i>Aspergillus carbonarius</i>	SEQ ID NO: 9	91,4 %
<i>Aspergillus flavus</i>	SEQ ID NO: 10	81,0 %
<i>Aspergillus aculeatus</i>	SEQ ID NO: 11	81,0 %
<i>Rasamsonia emersonii</i>	SEQ ID NO: 12	62,1 %

20 Se introdujo la sustitución P469L en *Aspergillus flavus*, *Aspergillus aculeatus* y *Rasamsonia emersonii*. Para evaluar la estabilidad térmica de la endoproteasa específica para prolina genitora y de los mutantes P469L, antes del ensayo de actividad se procedió a una incubación de alícuotas de 100 µL de una dilución de diez veces del sobrenadante de cultivo en tampón (0,1 M NaAc pH 4,5, con 50 mM de NaCl) a 60 °C durante 15 min en una placa de PCR en una máquina de PCR. Después de los 15 min de incubación, las muestras se enfriaron rápidamente hasta 25 °C en la máquina de PCR. Se midió el pNASU/mL de cada muestra. La actividad inicial medida antes de la incubación a temperatura elevada (0 minutos) se usó como referencia (100 %) para determinar la actividad residual.

25 Tabla 8. Actividad residual de endoproteasas específicas para prolina fúngicas que tienen una sustitución de aminoácido homólogo a P469L de PEP de *A. niger*, después de incubación durante 15' a 60 °C

Genitor	Actividad genitora	P469L
<i>A. niger</i>	100 %	62 %
<i>A. flavus</i>	100 %	3 %
<i>A. aculeatus</i>	100 %	18 %
<i>R. emersonii</i>	100 %	85 %

30 Los resultados en la Tabla 8 muestran que una sustitución de aminoácido en la posición 469, es decir, P469L no solo reduce la termoestabilidad en la endoproteasa específica para prolina de *Aspergillus niger*, sino que también en

posiciones homólogas en endoproteasas específicas para prolina de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus aculeatus* y *Rasamsonia emersonii*.

Ejemplo 6. Especificidad para sustrato de las endoproteasas específicas para prolina

Para confirmar que los mutantes son endoproteasas específicas para prolina, se evaluó la especificidad para el sustrato de diferentes mutantes de PEP usando citocromo c de corazón de caballo. Se incubaron diluciones del sobrenadante de cultivo preparado en el Ejemplo 1 con citocromo c de corazón de caballo (Sigma) que tenía la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. El sustrato se preparó al disolver 1 mg/mL de citocromo c en 100 mM de tampón de acetato de sodio, pH 4,5 y calentar a 95 °C durante 15 min. El sobrenadante del cultivo se diluyó en 100 mM de tampón NaAc pH 4,5 y se incubó con la disolución de sustrato de citocromo c a 50 °C durante 3 horas.

La reacción se detuvo mediante dilución en agua y adición de 0,4M NaOH para subir el pH hasta 10. Las mezclas de reacción incubadas se analizaron en un Accela UHPLC (Thermo Electron, Breda, Países Bajos) acoplado a un LTQ-Orbitrap Fourier Transform Mass Spectrometer (Thermo Electron, Bremen, Alemania). La separación cromatográfica se logró con una columna C-18 Eclipse XDB Zorbax de 2,1 × 50 mm, tamaño de partícula 1,8 μm, tamaño de poro 80Å (Agilent Santa Clara, CA, EE. UU.), usando una elución con gradiente con (A) agua de grado LC-MS que contenía ácido fórmico al 0,1 % y (B) acetonitrilo de grado LC-MS que contenía disolución de ácido fórmico al 0,1 % (Biosolve BV, Países Bajos) como fases móviles. El gradiente de 25 min se inició a partir de 0 %, se mantuvo así durante 1 minuto y después se aumentó linealmente hasta 40 % (B) en 14 min, después se lavó con 80 % de (B) durante 4 min y se reequilibró con 0 % de (B) durante 5 min. La velocidad de flujo se mantuvo a 0,4 ml/min, usando un volumen de inyección de 5 μl y la temperatura de la columna fue de 50 °C. La adquisición de los datos de espectrometría de masas se logró con adquisición dependiente de datos Top 3 usando las opciones "Cromatografía" y "Exclusión dinámica" en las que se incluyeron solo y estados de carga 2 y 3. La resolución para la exploración de FT MS fue de 15000 y se barrió para un intervalo m/z de 210-2000, mientras que los experimentos de MS/MS se llevaron a cabo en la trampa de iones. El ancho de aislamiento se fijó en 3,0 m/z y la energía de colisión normalizada se fijó en 35. La identificación de péptidos se llevó a cabo usando datos secuenciados con masa precisa y MS/MS de novo.

Cuando los principales péptidos SEQ ID NO: 4 a SEQ ID NO: 8, en particular SEQ ID NO: 4 a SEQ ID NO: 6, se forman, esto muestra que las endoproteasas específicas para prolina mutantes tienen actividad de endoproteasa específica para prolina, es decir, tienen una preferencia por un corte en una posición donde hay un residuo prolina en el péptido. Esto se confirmó para P469D, P469F, P469G, P469H, P469N, P469Q, P469S, P469T y P469W (los resultados no se muestran)

Listado de secuencias

- <110> DSM IP Assets B.V.
- <120> Endoproteasa específica para prolina y su uso
- <130> 30378-WO-PCT
- <160> 16
- <170> BiSSAP 1.2
- <210> 1
- <211> 521
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Endoproteasa específica para prolina de *A. niger*, con secuencia señal de Pectinametilesterasa

<400> 1
 Met Val Lys Ser Ile Leu Ala Ser Val Phe Phe Ala Ala Thr Ala Leu
 1 5 10 15
 Ala Ala Arg Pro Arg Leu Val Pro Lys Pro Val Ser Arg Pro Ala Ser
 20 25 30
 Ser Lys Ser Ala Ala Thr Thr Gly Glu Ala Tyr Phe Glu Gln Leu Leu
 35 40 45
 Asp His His Asn Pro Glu Lys Gly Thr Phe Ser Gln Arg Tyr Trp Trp
 50 55 60
 Ser Thr Glu Tyr Trp Gly Gly Pro Gly Ser Pro Val Val Leu Phe Thr
 65 70 75 80
 Pro Gly Glu Val Ser Ala Asp Gly Tyr Glu Gly Tyr Leu Thr Asn Glu
 85 90 95
 Thr Leu Thr Gly Val Tyr Ala Gln Glu Ile Gln Gly Ala Val Ile Leu
 100 105 110
 Ile Glu His Arg Tyr Trp Gly Asp Ser Ser Pro Tyr Glu Val Leu Asn
 115 120 125
 Ala Glu Thr Leu Gln Tyr Leu Thr Leu Asp Gln Ala Ile Leu Asp Met
 130 135 140
 Thr Tyr Phe Ala Glu Thr Val Lys Leu Gln Phe Asp Asn Ser Thr Arg
 145 150 155 160
 Ser Asn Ala Gln Asn Ala Pro Trp Val Met Val Gly Gly Ser Tyr Ser
 165 170 175
 Gly Ala Leu Thr Ala Trp Thr Glu Ser Val Ala Pro Gly Thr Phe Trp
 180 185 190
 Ala Tyr His Ala Thr Ser Ala Pro Val Glu Ala Ile Tyr Asp Tyr Trp
 195 200 205
 Gln Tyr Phe Tyr Pro Ile Gln Gln Gly Met Ala Gln Asn Cys Ser Lys
 210 215 220
 Asp Val Ser Leu Val Ala Glu Tyr Val Asp Lys Ile Gly Lys Asn Gly
 225 230 235 240
 Thr Ala Lys Glu Gln Ala Leu Lys Glu Leu Phe Gly Leu Gly Ala
 245 250 255
 Val Glu His Phe Asp Asp Phe Ala Ala Val Leu Pro Asn Gly Pro Tyr
 260 265 270
 Leu Trp Gln Asp Asn Asp Phe Ala Thr Gly Tyr Ser Ser Phe Phe Gln
 275 280 285
 Phe Cys Asp Ala Val Glu Gly Val Glu Ala Gly Ala Ala Val Thr Pro
 290 295 300
 Gly Pro Glu Gly Val Gly Leu Glu Lys Ala Leu Ala Asn Tyr Ala Asn
 305 310 315 320
 Trp Phe Asn Ser Thr Ile Leu Pro Asp Tyr Cys Ala Ser Tyr Gly Tyr
 325 330 335
 Trp Thr Asp Glu Trp Ser Val Ala Cys Phe Asp Ser Tyr Asn Ala Ser
 340 345 350
 Ser Pro Ile Tyr Thr Asp Thr Ser Val Gly Asn Ala Val Asp Arg Gln
 355 360 365
 Trp Glu Trp Phe Leu Cys Asn Glu Pro Phe Phe Tyr Trp Gln Asp Gly
 370 375 380
 Ala Pro Glu Gly Thr Ser Thr Ile Val Pro Arg Leu Val Ser Ala Ser
 385 390 395 400
 Tyr Trp Gln Arg Gln Cys Pro Leu Tyr Phe Pro Glu Thr Asn Gly Tyr
 405 410 415
 Thr Tyr Gly Ser Ala Lys Glu Lys Asn Ala Ala Thr Val Asn Ser Trp
 420 425 430
 Thr Gly Gly Trp Asp Met Thr Arg Asn Thr Thr Arg Leu Ile Trp Thr
 435 440 445
 Asn Gly Gln Tyr Asp Pro Trp Arg Asp Ser Gly Val Ser Ser Thr Phe
 450 455 460
 Arg Pro Gly Gly Pro Leu Ala Ser Thr Ala Asn Glu Pro Val Gln Ile
 465 470 475 480
 Ile Pro Gly Gly Phe His Cys Ser Asp Leu Tyr Met Ala Asp Tyr Tyr
 485 490 495
 Ala Asn Glu Gly Val Lys Lys Val Val Asp Asn Glu Val Lys Gln Ile
 500 505 510
 Lys Glu Trp Val Glu Glu Tyr Tyr Ala
 515 520

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..1566
 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota=" Endoproteasa específica para prolina de A. niger, con secuencia señal de Pectinametilesterasa" /mol_tipo="AND no asignado"
 <400> 2
 atggtaagt ccatacgttgc ctccgtatcc ttgcgtgcca ctgtatgtc tgcaaggcct 60
 cgtctcgttc ccaagccgtt ttctcgccc gccagctcca agtccgctgc tactactgg 120
 gaggcctact ttgaacagct gttggaccac cacaaccctg agaagggtac tttctcgcaa 180
 agatactggt ggagcaccga gtactgggt ggtccggat ccccccgttgt cctgttcact 240
 cccggtgagg tcagcgctga tggctacgag ggttatctga ccaacgagac tctcaccgg 300
 gtctacgccc aggagattca gggtgctgtc atcctgatcg aacaccgata ctgggggtgac 360
 tcgtctccct acggaggtgct gaacggcggact ctctccaggacttgcgttcc 420
 atccttgata tgacctactt cgccgaaacc gtcaagctcc agtttgacaa ctccacccgc 480
 tccaaacgctc agaacgctcc ttgggttatg gtcggcggca gctacagcgg tgctctgact 540
 gcttggaccg agtccggttc tcccgccacc ttctgggctt accacgcccccttgcgttcc 600
 gttgaggcca tctacgacta ctggcaataac ttctacccca ttcagcaggg tatggctcag 660
 aactgctcca aagatgtctc tctttagca gaatacgtcg acaagatcgg caagaacggc 720
 actgccaagg agcaacaggc tctgaaggag ctttccggcc taggagcgttgcgttcc 780
 gacgacttcg ccgtgttct gcccaacggt ctttccgttctt ggcaagacaa cgactttgcc 840
 accggttact ttctttctt ccagttctgt gatggccgtcg aggggtgtcga ggctgggtgt 900
 gccgtcaccc ccggccttga aggtgttggc ctggaaaagg cccttgctaa ctacgcgaac 960
 tggttcaact ctaccatcct ccccgattac tgcggccagct acggctactg gactgacgag 1020
 tggccgtcg cctgcttcga ctccataac gccttcttctt ctatatacac cgacaccaggc 1080
 gttggtaacg ccgtcgaccg tcagtggag tggccctctt gcaatgagcc ttcttttac 1140
 tggcaggacg gtgcggccgg gggtaacttca acgatagttac cccgcttaatgttgcgttcc 1200
 tactggcagc gtcaatgtcc gttgtacttc cccgagacta acggttacac ctacggctcc 1260
 gccaaggaa agaacgcccgc caccgtcaac agtggaccg gtggctggga catgaccgg 1320
 aacaccaccc gtctgatctg gacgaacggc caatacgtacc cctggcgtga ctccgggttc 1380
 tcttccaccc tccggccgg tggccctctt gtttcgaccg ccaacgagcc cgccagata 1440
 atacccggtg gttccattt ctccgaccc tacatggcag actactacgc caacgaggc 1500
 gtcaagaagg ttgtcgacaa cgaagtcaaa caaatcaagg agtgggttga ggaataactac 1560
 gcgtaa
 <210> 3
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de citocromo C de corazón de caballo

<400> 3
 Gly Asp Val Glu Lys Gly Lys Lys Ile Phe Val Gln Lys Cys Ala Gln
 1 5 10 15
 Cys His Thr Val Glu Lys Gly Gly Lys His Lys Thr Gly Pro Asn Leu
 20 25 30
 His Gly Leu Phe Gly Arg Lys Thr Gly Gln Ala Pro Gly Phe Thr Tyr
 35 40 45
 Thr Asp Ala Asn Lys Asn Lys Gly Ile Thr Trp Lys Glu Glu Thr Leu
 50 55 60
 Met Glu Tyr Leu Glu Asn Pro Lys Lys Tyr Ile Pro Gly Thr Lys Met
 65 70 75 80
 Ile Phe Ala Gly Ile Lys Lys Lys Thr Glu Arg Glu Asp Leu Ile Ala
 85 90 95
 Tyr Leu Lys Lys Ala Thr Asn Glu
 100

<210> 4
 <211> 30
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Fragmento de citocromo C digerido con PEP

<400> 4
 Gly Asp Val Glu Lys Gly Lys Lys Ile Phe Val Gln Lys Cys Ala Gln
 1 5 10 15
 Cys His Thr Val Glu Lys Gly Gly Lys His Lys Thr Gly Pro
 10 20 25 30

<210> 5
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Fragmento de citocromo C digerido con PEP

<400> 5
 Asn Leu His Gly Leu Phe Gly Arg Lys Thr Gly Gln Ala Pro
 1 5 10

20 <210> 6
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Fragmento de citocromo C digerido con PEP

25 <400> 6
 Gly Phe Thr Tyr Thr Asp Ala Asn Lys Asn Lys Gly Ile Thr Trp Lys
 1 5 10 15
 Glu Glu Thr Leu Met Glu Tyr Leu Glu Asn Pro Lys Lys Tyr Ile Pro
 20 25 30

<210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Fragmento de citocromo C digerido con PEP

<400> 7
 Gly Thr Lys Met Ile Phe Ala
 1 5

35 <210> 8
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Fragmento de citocromo C digerido con PEP

<400> 8
 Gly Ile Lys Lys Lys Thr Glu Arg Glu Asp Leu Ile Ala Tyr Leu Lys
 1 5 10 15
 Lys Ala Thr Asn Glu
 20

<210> 9
 <211> 521
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Endoproteasa específica para prolina (PEP) de Aspergillus carbonarius con secuencia señal de pectinametilesterasa de A. niger y prosecuencia de PEP de A. niger BC2G075
 <400> 9
 Met Val Lys Ser Ile Leu Ala Ser Val Phe Phe Ala Ala Thr Ala Leu
 1 5 10 15
 Ala Ala Arg Pro Arg Leu Val Pro Lys Pro Val Ser Arg Pro Ala Ser
 20 25 30
 Ser Thr Ser Ala Ala Thr Thr Gly Glu Ala Tyr Phe Glu Gln Leu Val
 35 40 45
 Asp His His Asn Pro Glu Lys Gly Thr Phe Ser Gln Arg Tyr Trp Trp
 50 55 60
 Ser Thr Glu Tyr Trp Gly Pro Gly Ser Pro Val Val Leu Phe Thr
 65 70 75 80
 Pro Gly Glu Val Ser Ala Asp Gly Tyr Glu Gly Tyr Leu Thr Asn Asp
 85 90 95
 Thr Leu Thr Gly Val Tyr Ala Gln Glu Ile Gln Gly Ala Val Val Leu
 100 105 110
 Ile Glu His Arg Tyr Trp Gly Asp Ser Ser Pro Tyr Glu Val Leu Asn
 115 120 125
 Ala Glu Thr Leu Gln Tyr Leu Thr Leu Asp Gln Ala Val Leu Asp Met
 130 135 140
 Thr Tyr Phe Ala Glu Thr Val Lys Phe Gln Phe Asp Asn Ser Thr Arg
 145 150 155 160
 Ser Asn Ala Gln Asn Ala Pro Trp Val Met Val Gly Gly Ser Tyr Ser
 165 170 175
 Gly Ala Leu Thr Ala Trp Val Glu Ser Val Ala Pro Gly Thr Phe Trp
 180 185 190
 Ala Tyr His Ala Thr Ser Ala Pro Val Glu Ala Ile Tyr Asp Phe Trp
 195 200 205
 Gln Tyr Phe Tyr Pro Ile Ser Gln Gly Met Ala Gln Asn Cys Ser Lys
 210 215 220
 Asp Val Ser Arg Val Ala Glu His Val Asp Lys Val Gly Lys Ser Gly
 225 230 235 240
 Thr Ala Glu Glu Gln Gln Lys Leu Lys Glu Leu Phe Gly Leu Gly Ala
 245 250 255
 Leu Glu His Tyr Asp Asp Phe Ala Ala Val Leu Pro Asn Gly Pro Tyr
 260 265 270
 Leu Trp Gln Asp Asn Asp Phe Ala Thr Gly Tyr Ser Glu Phe Phe Gln
 275 280 285
 Phe Cys Asp Ala Val Glu Gly Val Glu Ala Gly Ala Ala Val Thr Pro
 290 295 300
 Gly Pro Glu Gly Val Gly Leu Glu Lys Ala Leu Ala Asn Tyr Ala Tyr
 305 310 315 320
 Trp Phe Asn Ser Thr Leu Leu Pro Asn Tyr Cys Ala Ser Tyr Gly Tyr
 325 330 335
 Trp Ser Asp Glu Trp Ser Val Ala Cys Phe Asp Ser Tyr Asn Ala Ser
 340 345 350
 Ser Pro Leu Phe Thr Asp Thr Ser Val Asp Asn Ala Val Asp Arg Gln
 355 360 365
 Trp Glu Trp Phe Leu Cys Asn Glu Pro Phe Phe Trp Trp Gln Asp Gly
 370 375 380
 Ala Pro Glu Asp Val Thr Thr Ile Val Pro Arg Leu Val Asn Ala Glu
 385 390 395 400
 Tyr Trp Gln Arg Gln Cys Ser Leu Tyr Phe Pro Glu Thr Asn Gly Tyr
 405 410 415
 Thr Phe Gly Ser Ala Lys Asn Lys Thr Ala Ala Thr Val Asn Asp Trp
 420 425 430

Thr Gly Gly Trp Phe Glu Thr Arg Asn Thr Thr Arg Leu Ile Trp Thr
 435 440 445
 Asn Gly Gln Tyr Asp Pro Trp Arg Asp Ser Gly Val Ser Ser Thr Phe
 450 455 460
 Arg Pro Gly Gly Gln Leu Val Ser Thr Ala Asn Glu Pro Val Gln Ile
 465 470 475 480
 Ile Pro Gly Gly Phe His Cys Ser Asp Leu Tyr Met Ala Asp Tyr Tyr
 485 490 495
 Ala Asn Ala Gly Val Arg Lys Val Val Asp Asn Glu Val Ala Gln Ile
 500 505 510
 Lys Lys Trp Val Ala Glu Tyr Tyr Ala
 515 520

<210> 10
 <211> 521
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Endoproteasa específica para prolina (PEP) de Aspergillus_flavus con secuencia señal de
 pectinametilesterasa de A. niger y prosecuencia de PEP de A. niger BC2G077

10 <400> 10
 Met Val Lys Ser Ile Leu Ala Ser Val Phe Phe Ala Ala Thr Ala Leu
 1 5 10 15
 Ala Ala Arg Pro Arg Leu Val Pro Lys Pro Val Ser Arg Pro Ala Ser
 20 25 30
 Ser Lys Ser Ala Ala Thr Thr Gly Glu Ala Tyr Phe Glu Gln Leu Leu
 35 40 45
 Asp His His Asp Ser Ser Lys Gly Thr Phe Ser Gln Arg Tyr Trp Trp
 50 55 60
 Ser Thr Glu Tyr Trp Gly Gly Pro Gly Ser Pro Val Val Leu Phe Thr
 65 70 75 80
 Pro Gly Glu Ala Ser Ala Asp Gly Tyr Glu Gly Tyr Leu Thr Asn Asn
 85 90 95
 Thr Leu Thr Gly Leu Tyr Ala Gln Glu Ile Gln Gly Ala Val Ile Leu
 100 105 110
 Ile Glu His Arg Tyr Trp Gly Asp Ser Ser Pro Tyr Glu Glu Leu Thr
 115 120 125
 Ala Glu Thr Leu Gln Tyr Leu Thr Leu Glu Gln Ser Ile Leu Asp Leu
 130 135 140
 Thr His Phe Ala Glu Thr Val Gln Leu Glu Phe Asp Thr Ser Asn Ser
 145 150 155 160
 Ser Asn Ala Pro Lys Ala Pro Trp Val Leu Val Gly Gly Ser Tyr Ser
 165 170 175
 Gly Ala Leu Ala Ala Trp Thr Ala Ala Val Ala Pro Gly Thr Phe Trp
 180 185 190
 Ala Tyr His Ala Thr Ser Ala Pro Val Gln Ala Ile Asp Asp Phe Trp
 195 200 205
 Gln Tyr Phe Asp Pro Ile Arg His Gly Met Ala Pro Asn Cys Ser Arg
 210 215 220
 Asp Val Ser Leu Val Ala Asn His Ile Asp Thr Val Gly Lys Asn Gly
 225 230 235 240
 Ser Ala Ala Asp Gln Leu Ala Leu Lys Glu Leu Phe Gly Leu Glu Ala
 245 250 255
 Leu Glu His Tyr Asp Asp Phe Ala Ala Leu Pro Thr Gly Pro Tyr
 260 265 270
 Leu Trp Gln Ser Asn Thr Phe Val Thr Gly Tyr Ser Asn Phe Phe Ala
 275 280 285
 Phe Cys Asp Ala Val Glu Asn Val Glu Ala Gly Ala Ala Val Val Pro
 290 295 300
 Gly Pro Glu Gly Val Gly Leu Gln Lys Ala Leu Thr Gly Tyr Ala Asn

305 310 315 320
 Trp Phe Asn Ser Thr Ile Ile Pro Gly Tyr Cys Ala Ser Tyr Gly Tyr
 325 330 335
 Trp Thr Asp Asn Arg Thr Val Ala Cys Phe Asp Thr His Asn Pro Ser
 340 345 350
 Ser Ala Ile Phe Thr Asp Thr Ser Val Asp Asn Ala Val Asp Arg Gln
 355 360 365
 Trp Gln Trp Phe Leu Cys Asn Glu Pro Phe Phe Trp Trp Gln Asp Gly
 370 375 380
 Ala Pro Glu Gly Val Pro Thr Ile Val Pro Arg Thr Ile Asn Ala Glu
 385 390 395 400
 Tyr Trp Gln Arg Gln Cys Ser Leu Tyr Phe Pro Glu Val Asn Gly Tyr
 405 410 415
 Thr Tyr Gly Ser Ala Lys Gly Lys Thr Ala Ala Thr Val Asn Thr Trp
 420 425 430
 Thr Gly Gly Trp Ser Asp Ser Lys Asn Thr Ser Arg Leu Leu Trp Val
 435 440 445
 Asn Gly Gln Tyr Asp Pro Trp Arg Asp Ser Gly Val Ser Ser Thr His
 450 455 460
 Arg Pro Gly Gly Pro Leu Thr Ser Thr Ala Asp Glu Pro Val Gln Val
 465 470 475 480
 Ile Pro Gly Gly Phe His Cys Ser Asp Leu Tyr Leu Lys Asp Tyr Phe
 485 490 495
 Ala Asn Ala Gly Val Lys Gln Val Val Asp Asn Ala Val Ala Gln Ile
 500 505 510
 Lys Ser Trp Val Ala Glu Tyr Tyr Lys
 515 520

<210> 11
 <211> 521
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Endoproteasa específica para prolina (PEP) de *Aspergillus_aculeatus* con secuencia señal de pectinametilesterasa de *A. niger* y prosecuencia de PEP de *A. niger* BC2G076

10 <400> 11
 Met Val Lys Ser Ile Leu Ala Ser Val Phe Phe Ala Ala Thr Ala Leu
 1 5 10 15
 Ala Ala Arg Pro Arg Leu Val Pro Lys Pro Val Ser Arg Pro Ala Ser
 20 25 30
 Ser Lys Ser Ala Ala Thr Thr Gly Glu Ala Tyr Phe Glu Gln Leu Ile
 35 40 45
 Asp His Ser Asp Pro Ser Lys Gly Thr Phe Ser Gln Arg Tyr Trp Tyr
 50 55 60
 Ser Ala Gln Tyr Trp Gly Gly Pro Gly Ser Pro Val Val Leu Phe Thr
 65 70 75 80
 Pro Gly Glu Val Ser Ala Asp Gly Tyr Gln Gly Tyr Leu Thr Asn Ala
 85 90 95
 Thr Leu Thr Gly Val Tyr Ala Gln Gln Leu Gln Gly Ala Val Val Leu
 100 105 110
 Val Glu His Arg Tyr Trp Gly Gly Ser Ser Pro Tyr Thr Asn Leu Thr
 115 120 125
 Ala Glu Thr Leu Gln Tyr Leu Thr Leu Glu Gln Ser Val Leu Asp Leu
 130 135 140
 Thr Tyr Phe Ala Glu Asn Val Lys Leu Gly Phe Asp Asn Ser Thr Ser
 145 150 155 160
 Ser Asn Ala Pro His Val Pro Trp Val Leu Val Gly Gly Ser Tyr Ser
 165 170 175
 Gly Ala Leu Thr Ala Trp Thr Glu His Leu Ala Pro Gly Thr Phe Trp
 180 185 190

Ala Tyr His Ala Thr Ser Ala Pro Val Glu Ser Ile Tyr Asp Phe Trp
 195 200 205
 Gln Tyr Phe Arg Pro Ile Gln Asp Gly Met Ala Lys Asn Cys Ser Lys
 210 215 220
 Asp Val Ser Leu Val Ala Glu His Val Asp Lys Ile Gly Lys Thr Gly
 225 230 235 240
 Thr Lys Ala Gln Gln Thr Glu Leu Lys Lys Leu Phe Gly Leu Glu Ala
 245 250 255
 Leu Glu His Phe Asp Asp Phe Ala Ala Val Leu Pro Ile Gly Pro Tyr
 260 265 270
 Leu Trp Gln Asp Asn Thr Phe Ala Thr Gly Tyr Ser Asp Phe Phe Ala
 275 280 285
 Phe Cys Asp Ala Val Glu Asn Val Glu Ala Gly Ala Ala Val Thr Pro
 290 295 300
 Gly Ala Glu Gly Val Gly Leu Glu Lys Ala Leu Thr Gly Tyr Ala Asn
 305 310 315 320
 Trp Phe Lys Asn Glu Ile Phe Pro Gly Tyr Cys Ala Ser Tyr Gly Tyr
 325 330 335
 Trp Ser Asp Glu Tyr Ser Val Ala Cys Tyr Asp Thr Tyr Asn Thr Thr
 340 345 350
 Ser Pro Leu Phe Thr Asp Thr Ser Val Asp Asn Ala Val Asp Arg Gln
 355 360 365
 Trp Gln Trp Phe Leu Cys Asn Glu Pro Phe Phe Trp Trp Gln Asp Gly
 370 375 380
 Ala Pro Ser Ser Glu Thr Thr Ile Val Pro Arg Leu Val Ser Ala Asp
 385 390 395 400
 Tyr Trp Gln Arg Gln Cys Ala Leu Tyr Phe Pro Glu Val Asn Gly Tyr
 405 410 415
 Thr Tyr Gly Ser Ala Lys Gly Lys Ser Ala Asn Thr Phe Asn Ala Trp
 420 425 430
 Thr Asp Gly Trp Phe Met Asn Gly Asn Ser Thr Arg Leu Ile Trp Thr
 435 440 445
 Asn Gly Gln Tyr Asp Pro Trp Arg Asp Ala Thr Val Ser Ser Thr Phe
 450 455 460
 Arg Pro Gly Gly Pro Leu Ala Ser Thr Pro Ser Glu Pro Val Gln Ile
 465 470 475 480
 Ile Pro Gly Gly Phe His Cys Ser Asp Leu Tyr Ile Ser Asp Ser Val
 485 490 495
 Val Asn Ala Gly Val Lys Lys Val Val Asp Asn Glu Val Ala Gln Ile
 500 505 510
 Lys Ala Trp Val Ala Glu Phe Tyr Ala
 515 520
<210> 12
<211> 526
5 <212> PRT
<213> Rasamsonia emersonii
<400> 12

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

100	105	110
Gly Ala Val Ile Val Leu Glu His Arg Tyr Trp Gly Gln Ser Ser Pro		
115	120	125
Tyr Asp Ser Leu Thr Thr Lys Asn Leu Gln Tyr Leu Thr Leu Lys Gln		
130	135	140
Ser Ile Ala Asp Leu Thr Tyr Phe Ala Lys Thr Val Lys Leu Pro Phe		
145	150	155
Asp Arg Asn Gly Ser Ser Asn Ala Asp Lys Ala Pro Trp Val Leu Ser		
165	170	175
Gly Gly Ser Tyr Ser Gly Ala Leu Ser Ala Trp Thr Ala Ser Thr Ser		
180	185	190
Pro Gly Thr Phe Trp Ala Tyr His Ala Ser Ser Ala Pro Val Glu Ala		
195	200	205
Ile Tyr Asp Tyr Trp Gln Tyr Phe Ala Pro Val Gln Asp Gly Leu Pro		
210	215	220
Ala Asn Cys Ser Lys Asp Leu Ser Arg Val Val Asp Tyr Ile Asp Ser		
225	230	235
Val Leu Gln Ser Gly Asn Ala Thr Ala Lys Gln Gln Leu Lys Asp Leu		
245	250	255
Phe Gly Leu Gly Ala Leu Glu His Asp Asp Asp Phe Ala Ser Ala Leu		
260	265	270
Glu Asn Gly Pro Trp Leu Trp Gln Ser Asn Ser Phe Tyr Asp Pro Tyr		
275	280	285
Pro Pro Val Tyr Glu Phe Cys Asp Tyr Val Glu Asn Ala Tyr Ala Ser		
290	295	300
Pro Pro Val Ala Ala Gly Pro Asp Gly Val Gly Leu Glu Lys Ala Leu		
305	310	315
Ser Gly Tyr Ala Thr Trp Trp Asn Lys Val Phe Phe Pro Gly Tyr Cys		
325	330	335
Ala Thr Tyr Gly Tyr Trp Ser Ser Asn Asp Ser Ile Ala Cys Phe Asp		
340	345	350
Thr Tyr Asn Gln Ser Ser Pro Met Phe Thr Asp Leu Ser Val Ser Asn		
355	360	365
Thr Ile Asn Arg Gln Trp Asn Trp Phe Leu Cys Asn Glu Pro Phe Phe		
370	375	380
Tyr Trp Gln Asp Gly Ala Pro Lys Asn Val Pro Ser Ile Val Ser Arg		
385	390	395
Leu Val Thr Ala Glu Tyr Trp Gln Arg Gln Cys Pro Leu Phe Phe Pro		
405	410	415
Glu Glu Asp Gly Tyr Thr Tyr Gly Ser Ala Lys Gly Lys Thr Ala Ala		
420	425	430
Asp Val Asn Ala Trp Thr Lys Gly Trp Phe Leu Thr Asn Thr Thr Arg		
435	440	445
Leu Ile Trp Thr Asn Gly Glu Leu Asp Pro Trp Arg Ser Ala Gly Val		
450	455	460
Ser Ser Lys Phe Arg Pro Gly Gly Pro Leu Gln Ser Thr Pro Gln Ala		
465	470	475
Pro Leu Gln Leu Ile Pro Glu Gly Val His Cys Tyr Asp Leu Ile Leu		
485	490	495
Lys Asn Ala Glu Ala Asn Ala Gly Val Gln Arg Val Val Thr Asn Glu		
500	505	510
Val Ala Gln Ile Lys Ala Trp Val Asn Glu Tyr Tyr Arg Lys		
515	520	525

<210> 13

<211> 1565

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<222> 1..1565

10 <223> /organismo="Secuencia artificial" /nota=" Endoproteasa específica para prolina (PEP) de Aspergillus_carbonarius con secuencia señal de pectinametilesterasa de A. niger y prosecuencia de PEP de A. niger BC2G075" /mol_tipo="ADN no asignado"

	<400> 13	
	atggtaagt ccattcctggc ctccgttta ttcgctgcca ctgttattgc tgcttagtact	60
	cgcttagtgc ccaagccccgt gtctcgcccc gctccagca cttctgcgcg caccacccgt	120
	gaggcctact tcgagcagct gggtgaccac cacaaccccg agaagggcac cttctccag	180
	cgtactggt ggagcactga gtactgggt ggtcccggtt ccccccgttgt cctcttcacc	240
	cccggtgaag tctctgccga tggctacgag ggctacctga ccaacgacac cctgaccgg	300
	gtctacgctc aggagatcca gggtgctgtt gtgttgattt agcaccgtt ctggggcgac	360
	agcagccccct acgagggtcct caaccccggag actctccagt acctgacccct cgaccaggct	420
	gtccttgaca tgacctactt cgctgagact gtcaagttcc agttcgacaa ctcgacccgc	480
	agcaacgccc agaacgctcc ttgggtgatg gtcgggtggaa gctactctgg tgctctcacc	540
	gcctgggttg agtccgtcgc tccttggacc ttctggccct accacgcccac ctccggctct	600
	gttggaggcca tctacgactt ctggcagtac ttctacccca tctcccaagg tatggcccag	660
	aactgctcca aggatgtctc ccgttttgct gagcacgttg acaaggtcgg caagtctggc	720
	actgctgagg agcagcagaa gctcaaggaa ctcttcggtc ttgggtctct tgagcactac	780
	gatgacttcg ctgctgtcct ccccaacggc ccctacctct ggcaggacaa cgacttcgccc	840
	actggatact ccgagttctt ccagttctgc gatgcccgtgg agggtgtgaa agccgggtgt	900
	gctgtgaccc cccggccccga ggggtttgggt cttgagaagg ctctggccaa ctacgcttac	960
	tggttcaact cgactctcct tcccaactac tgcgttccct acggctactg gtccggatgag	1020
	tggccgttg cctgcttcga ctccctacaac gcctcttctc ctctgttac acacaccc	1080
	gttgacaacg ccgttgaccc tcagtggaa tggttctct gcaacgaacc tttcttctgg	1140
	tggcaggatg gtgctcccgaa ggatgtcacc accattgtgc ctctgttgtt caacgcggaa	1200
	tactggcagc gtcagtgcctc tctgtacttc cccgaaacca acggctacac ctccgggttcc	1260
	gccaagaaca agactgtgc caccgtcaac gactggactg gtggctgggtt cgaaacccgc	1320
	aacaccaccc gtctcatctg gaccaacggc cagtagcacc cctggcgcga cagcgggtgc	1380
	tcttccacct tccgtcctgg tggccagctc gtcagcactg ccaacgagcc tgtccagatc	1440
	atccccggtg gttccactg ctcggatctg tacatggccg actactacgc caacgcgggt	1500
	gtccgcaagg tcgtcgacaa cgaggttgct cagatcaaga agtgggttgc tgagtactac	1560
	gccta	1565
5	<210> 14	
	<211> 1565	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<221> fuente	
	<222> 1..1565	
10	<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota=" Endoproteasa específica para prolina (PEP) de A. flavus con secuencia señal de pectinametilesterasa de A. niger y prosecuencia de PEP de A. niger" /mol_tipo="ADN no asignado"	

	<400> 14	
	atggtaagt ccatcctggc ctccgtttc ttccggcca ctgctctggc tgctcgcccc	60
	cgcttggttc ccaagccgt ctctcgccc gccagcagca agtcggctgc caccacccgt	120
	gaaggctact tcgagcagct cttgaccac cacgacttt ccaaggcac cttctccag	180
	cgttacttgt ggagcactga gtactgggt ggtccggaa gcccgttgt cctctcaact	240
	cccggtgagg cctccggca tggctacgag ggataacctga ccaacaacac cctgaccgg	300
	ctgtacgctc aggagatcca gggtggcgtc atcttgattt agcaccgtt cttggggcgt	360
	tcttctccct acgaggagct gaccgctgaa accctccagt acctcacccct ggagcagtcc	420
	attttggatc tgacccactt cgctgagact gtccagttt agttcgacac cagcaactcc	480
	tccaaacgccc ccaaggcccc ctgggttctc gtcggggaa gctactctgg tgctcttgct	540
	gcctggactg ctgctgttgc ttctggacc ttctggccct accacgcccac ctggcgtact	600
	gtgcaggcca ttgatgactt ctggcgttac ttccgacccca tccgtcacgg aatggctccc	660
	aactgctctc gtgatgtctc ctcgtcgcc aaccacatcg acaccgtcgg caagaacggc	720
	tctgctgccc accagcttgc tctgaaggag ctgttcggc ttgaggctct cgaacactac	780
	gatgacttcg ctgctgccct tcccacttgt ccctacctct ggcagtccaa caccttcgtc	840
	accggctact ccaacttctt cgcttctgc gatgccgttg agaacgtoga ggctgggtct	900
	gctgtggtgc ctggcccgaa ggggtttgggt ctgcagaagg cttgactgg ctacgccaac	960
	tggttcaact cgaccatcat ccctggctac tgcgttctct acggctactg gactgacaac	1020
	cgcaccgttg ctgcgttgcgaccc caccacaaac cccagctctg ccatcttac cgcacaccc	1080
	gtcgataacg ccgtcgaccg ccagtggcag tggccctct gcaacgagcc cttcttctgg	1140
	tggcaggatg gtgcgttgc ggggtttccct accattgtgc ctcgcaccat caacgcccggaa	1200
	tactggcagc gccagtgc tctctacttc cccgaagtca acggctacac ctacggctcc	1260
	gccaaggcca agactgctgc cactgtcaac acctggactg gtggctggc cgacacgcaag	1320
	aacaccagcc gtctcctctg ggtgaacggc cagtcgacc cctggcgtga ctccgggtgc	1380
	tcctccaccc accggccctgg tggcgttgc accagcactg ccgtgagcc cgtcgggtgc	1440
	atccccggtg gttccactg ctggacccctc tacctcaagg actacttcgc caacgcccgg	1500
	gtcaaggcagg tcgtcgacaa cggccgttgc cagatcaagt cctgggttgc tgaataactac	1560
	aaata	1565
5	<210> 15	
	<211> 1565	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<221> fuente	
	<222> 1..1565	
	<223> /organismo="Secuencia artificial" /nota=" Endoproteasa específica para prolina (PEP) de Aspergillus_aculeatus con secuencia señal de pectinametilesterasa de A. niger y prosecuencia de PEP de A. niger BC2G076" /mol_tipo="ADN no asignado"	

<400> 15
 atggtaagt ccattcttc ctccgtttc ttgcgtgcca ctgttgc tgctcgccc 60
 cgtctcgcc ccaagccccgt ctccggcccc gccagcagca agtctgctgc caccacccgt
 gaaggctact tcgagcagct gatcgaccac tccgaccctt ccaagggtac tttctccag 120
 cgctactggt actctgctca gtactgggt ggtcctggca gcccgttgtt cctcttcact
 cctggtaag tgtctgccga tggctaccag ggctacctca ccaacgcccac cctgaccgg 180
 gtctacgctc agcagctcca gggtgccgtt gtccctcgctc agcaccggta ctggggcg 240
 agctctccct acaccaactt gactgttagt actctccagt acttgacttt ggagcagagc
 gtgcttgacc tgacctactt cgctgagaac gtcaagctcg gtttcgacaa ctcgaccc 300
 tccaaacgctc ctcacgtccc ctgggtctg gtcgggtggaa gctactctgg tgctctgacc 360
 gcctggaccg aacacctggc tcctggcacc ttctggccct accacgcccac ctgggtcc 360
 gtggagagca tctacgactt ctggcagtac ttccgtccca tccaggatgg catggccaag 420
 aactgctcca aggatgtctc gctagttgtt gaacacgttg acaagatgg caagaccggc
 accaaggccc agcagaccga gctgaagaag ctcttcggtc tggaaaggccct tgaacacttc 480
 gatgacttcg ctgctgtcct tcccattggt ccctacctctt ggcaggacaa caccttcg 540
 actggatact ccgacttctt cgccctctgt gatggcgttg agaacgttga ggctgggtgt
 gctgtcaccc ccggtgctga gggtgtggt cttgagaagg ccctcaccgg atacgccaac 600
 tgggtcaaga acgagatctt ccccgatac tgcgttccct acggctactg gtcagatgag 660
 tactctgttg cctgctacga cacctacaac accacttctc cccttccac cgacaccc 720
 gtcgacaacg ccgttgaccg ccagtggcag tggttccctgt gcaacgagcc cttcttcg 780
 tggcaggatg gtgctccctc ctccgagact accattgtgc ctgcgttgtt ctctggcc 840
 tactggcagc gccagtgcgc tctctacttc cccgagggtca acggatacac ctacggctct
 gccaaggccc agtccgccaa cacttcaac gcctggactg atggctggtt catgaatggc 900
 aacagcaccc gtctgatctg gaccaacggc cagtagcacc ctggcgtga tgccaccgtc 960
 tcctccacct tccgccccgg tggtccctgt gcacggactc cttccgagcc tggcagatc 1020
 atccccggtg gattccactg ctggatctc tacatctccg actccgttgtt caacggcgtt
 gtcaagaagg ttgttgacaa cgaggttgtt cagatcaagg cttgggttgc tgagtttat 1080
 gcata 1565
 <210> 16
 <211> 1580
 <212> ADN
 <213> Rasamonia emersonii
 <220>
 5 <221> fuente
 <222> 1..1580
 <223> /organismo="Rasamonia emersonii" /mol_tipo="ADN no asignado"
 10

<400> 16
atgcacctccc tatactccct cgttgccttg actgttttc ttgttatctt ggatgtgtcc 60
gctgctcctc gtctccctct tccctctcgcc ctcccttgc ctccccgtga ccccttgcac 120
ggacctacca acgcctccgc cacttccag cagctcatcg accacaacca ccccgagtt 180
ggcaccttct cccagcgcta ctggtggaaat gatgagtctt ggaagggtcc cggctctccc 240
gttgtccctt tcaccccccgg tgaagaagat gccagcggtt acgtgggcta cctgaagaac 300
accaccatca ccggtctgtat cgctcagacc atcgggtggtg ccgtcatgtt cctgaacac 360
cgctactggg gccagtcctc cccctacgac tctctgacca ccaagaacct gcagtacctg 420
accctcaagc agtccattgc cgacccatcacc tacttcgcca agaccgtcaa gtccttc 480
gaccgcaacg gcagctccaa cgccgacaag gctccctggg ttctcagcgg tggaaagctac 540
tctggtgctc tctccgcctg gactgccagc acctccccgg gtactttctg ggcctaccac 600
gccagctctg ctcctgtta ggccatctac gattactggc agtacttcgc tccctgtcag 660
gatggattgc ctgccaactg ctcgaaggac ctctccctg tcgtcgacta catcgactcc 720
gttctccagt ccggcaacgc cactgccaag caacagctca aggacctttt cgggtctgggt 780
gctctggagc acgacgatga ctgcgcctcc gctttgaga acggcccttg gctctggcag 840
tcgaactcgt tctacgaccc ctaccctctt gtctacgagt tctgcgacta ctttgagaac 900
gcctacgcca gcccctccgt tgctgtggt cccgatggtg ttgggtctgga gaaggctctg 960
tctggctacg ccacctggtg gaacaaggtc ttcttccccgg gctactgcgc tacctacggc 1020
tactggctt ccaacgactc cattgcctgc ttgcacaccc acaaccagtc gtcgccccatg 1080
ttcaccgacc tttccgtctc caacactatc aaccgccagt ggaactggtt cctctgcaac 1140
gagcccttct tctactggca ggatgggtct cccaagaacg tccccagcat tgtctctctg 1200
ctggtcactg ctgagttactg gcagcgccag tgcccttgc tttccctga agaggatggc 1260
tacacctacg gaagcgccaa gggcaagact gctgccatg tcaacgcctg gaccaaggc 1320
tgggtcttga ctaacaccac ccgtctgtatc tggaccaacg gcgagttga cccctggcgc 1380
tctgctggtg tcagcagccaa gttccgtccc ggtggtcccc tccagtcaccc tccccaggct 1440
cctctgcagc tcattcccgaa ggggtccac tgctacgatc tgatcctcaa gaacgcccag 1500
gccaacgccc gttgtgcagcc gtttgtcacc aacgaggttt gtcagatcaa ggcctgggt 1560
aacgaataact accgtaaatgt 1580

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que tiene actividad de endoproteasa específica para prolina, en donde el polipéptido se selecciona del grupo que consiste en:
 - i. un polipéptido, que tiene al menos 91 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 1, y que, cuando se alinea con una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 1 comprende un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala (A), Cys (C), Asp (D), Phe (F), Gly (G), His (H), Ile (I), Lys (K), Leu (L), Met (M), Asn (N), Gln (Q), Arg (R), Ser (S), Thr (T), Val (V), Trp (W) y Tyr (Y) en una posición correspondiente a la posición 469, y opcionalmente un aminoácido de Phe (F) en la posición 204, Ser (S) en la posición 304, Ala (A) en la posición 377, Thr (T) en la posición 466 y/o Ala (A) en la posición 477, en donde la posición se define con respecto a la SEQ ID NO:1;
 - ii. un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 1, en donde la SEQ ID NO: 1 comprende al menos una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en P469A, P469C, P469D, P469F, P469G, P469H, P469I, P469K, P469L, P469M, P469N, P469Q, P469R, P469S, P469T, P469V, P469W y P469Y, y opcionalmente una sustitución de aminoácido I204F, P304S, P377A, P466T y/o P477A, en donde las sustituciones de aminoácidos se definen con respecto a la SEQ ID NO: 1;
 - iii. un polipéptido según i) a ii), pero que carece de una secuencia señal y/o una secuencia proproteína;
 - iv. un polipéptido según ii) a iii), en donde el polipéptido tiene al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 1; y,
 - v. un polipéptido codificado por un ácido nucleico que tiene 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con respecto a la SEQ ID NO: 2, o con respecto a una secuencia codificante madura de la SEQ ID NO: 2, en donde la SEQ ID NO: 2 comprende al menos una mutación que codifica al menos una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en P469A, P469C, P469D, P469F, P469G, P469H, P469I, P469K, P469L, P469M, P469N, P469Q, P469R, P469S, P469T, P469V, P469W y P469Y, y opcionalmente en donde la SEQ ID NO: 2 comprende al menos una mutación adicional que codifica una sustitución de aminoácido I204F, P304S, P377A P466T y/o P477A, en donde las sustituciones de aminoácidos se definen con respecto a la SEQ ID NO: 1, en donde el polipéptido tiene menos de 70 % de actividad residual sobre acetil-AlaAlaPro-paranitroanilina (Ac-AAP-pNA) como sustrato después de que el polipéptido se ha mantenido a una temperatura de 65 °C durante 15 min.
2. Un polipéptido que es un polipéptido aislado, sustancialmente puro, puro, recombinante o sintético del polipéptido de la reivindicación 1.
- 30 3. Un método para generar un polipéptido variante, en donde el método comprende
 - i. seleccionar un polipéptido genitor que comprende al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 1, o con respecto a un polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1; y,
 - ii. sustituir al menos un aminoácido en una posición correspondiente a la posición 469 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala (A), Cys (C), Asp (D), Phe (F), Gly (G), His (H), Ile (I), Lys (K), Leu (L), Met (M), Asn (N), Gln (Q), Arg (R), Ser (S), Thr (T), Val (V), Trp (W) y Tyr (Y), y opcionalmente sustituir un aminoácido en la posición 204 por Phe (F), en la posición 304 por Ser (S), en la posición 377 por Ala (A), en la posición 466 por Thr (T) y/o en la posición 477 por Ala (A); y
 - iii. generar el polipéptido variante,
- 40 40 en donde, opcionalmente, el polipéptido variante tiene menos de 70 % de actividad residual sobre acetil-AlaAlaPro-paranitroanilina (Ac-AAp-pNA) como sustrato después de que el polipéptido se ha mantenido a una temperatura de 65 °C durante 15 min.
4. Una composición que comprende un polipéptido según la reivindicación 1 o 2.
5. Una composición según la reivindicación 4, que comprende un vehículo, un excipiente o una enzima auxiliar.
- 45 45 6. Un ácido nucleico que codifica una endoproteasa específica para prolina, que tiene al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad secuencial con respecto a la SEQ ID NO: 2, o con respecto a una secuencia codificante madura de la SEQ ID NO: 2, en donde la SEQ ID NO: 2 comprende al menos una mutación que codifica al menos una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en P469A, P469C, P469D, P469F, P469G, P469H, P469I, P469K, P469L, P469M, P469N, P469Q, P469R, P469S, P469T, P469V, P469W, P469Y, y opcionalmente en donde la SEQ ID NO: 2 comprende al menos una mutación adicional que codifica una sustitución de aminoácido I204F, P304S, P377A, P466T y/o P477A, en donde las sustituciones de aminoácidos se definen con respecto a la SEQ ID NO: 1.

7. Un ácido nucleico que es un ácido nucleico aislado, sustancialmente puro, puro, recombinante o sintético del ácido nucleico de la reivindicación 6.
8. Un vector de expresión que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 6 o 7 enlazado funcionalmente con al menos una secuencia de control que dirige la expresión del polipéptido en una célula hospedante.
- 5 9. Una célula hospedante recombinante que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 6 o 7, o un vector de expresión según la reivindicación 9.
10. Un método para la preparación de un polipéptido según la reivindicación 1 o 2, que comprende cultivar una célula hospedante según la reivindicación 9 en un medio de fermentación adecuado, en condiciones que permiten la expresión del polipéptido y preparar el polipéptido y, opcionalmente, recuperar el polipéptido.
- 10 11. Un proceso para la preparación de un producto alimentario o pienso que comprende poner en contacto una forma intermedia de un producto alimentario o pienso con un polipéptido según la reivindicación 1 o 2, o una composición según la reivindicación 4 o 5, y preparar el producto alimentario o pienso.
12. Un proceso según la reivindicación 11, en donde el producto alimentario es una bebida, preferiblemente, una cerveza.
- 15 13. Un proceso según las reivindicaciones 11 o 12, en donde el producto alimentario comprende gluten.

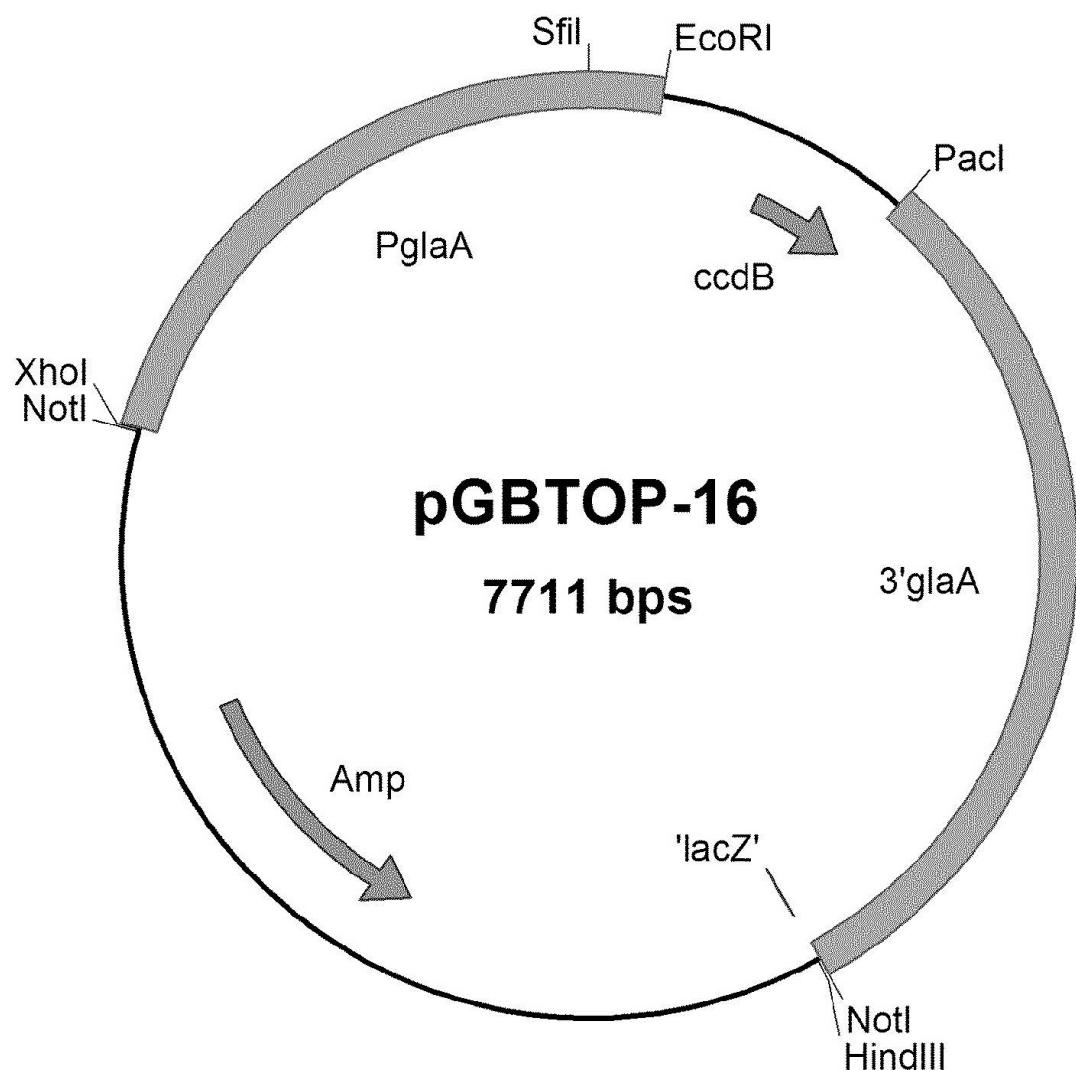


Fig. 1

ES 2 718 071 T3

	0	10	20	30	40	50	60															
<i>Aspergillus_niger</i> (PEP)														
<i>Aspergillus_carbonarius</i>	----MVKSI	LASVFFA	AATALAARPRLVPKPVS	RPA	SKSAA	TGEAYF	EQLLDHHNPEKGTFSQ	RYWWS														
<i>Aspergillus_flavus</i>	----MVKSI	LASVFFA	AATALAARPRLVPKPVS	RPA	SKSAA	TGEAYF	EQLLDHHNPEKGTFSQ	RYWWS														
<i>Aspergillus_aculeatus</i>	----MVKSI	LASVFFA	AATALAARPRLVPKPVS	RPA	SKSAA	TGEAYF	EQLIDHSDPSKGTF	SQRYWYS														
<i>Rasamsoni_emersonii</i>	MPLS	LSLVALT	ASLVS	LAAPR	PLPFP	PLPRDPLHG	PNTNASATFQQ	QQLIDHNHPELGTFSQ	RYWWN													
	70	80	90	100	110	120	130															
<i>Aspergillus_niger</i> (PEP)	TEYWGGPGSPVVL	FTPG	EVSA	DGYEGYL	TNETLTG	VYAAQE	IQGAVI	LIEHRYWGDS	SPYEV	LNAETLQYL												
<i>Aspergillus_carbonarius</i>	TEYWGGPGSPVVL	FTPG	EVSA	DGYEGYL	TNETLTG	VYAAQE	IQGAVV	LIEHRYWGDS	SPYEV	LNAETLQYL												
<i>Aspergillus_flavus</i>	TEYWGGPGSPVVL	FTPG	EVSA	DGYEGYL	TNETLTG	VYAAQE	IQGAVV	LIEHRYWGDS	SPYEV	LNAETLQYL												
<i>Aspergillus_aculeatus</i>	TEYWGGPGSPVVL	FTPG	EVSA	DGYEGYL	TNETLTG	VYAAQE	IQGAVV	LIEHRYWGDS	SPYEV	LNAETLQYL												
<i>Rasamsoni_emersonii</i>	DEFWK	GPGSPVVL	FTPG	EEAD	SGYVG	YGLKNTT	ITGLIA	QTIGG	AVIVL	EHRYWGQSS	SPYDSLTTKNLQYL											
	140	150	160	170	180	190	200															
<i>Aspergillus_niger</i> (PEP)	TLDQAI	LDMTYFA	ETVKLQFD	NSTRSNAQ	NAPPWV	MVGGSYSGALT	AWTE	SVAPGT	FWAY	HATSAPVEAIY												
<i>Aspergillus_carbonarius</i>	TLDQAV	LDMTYFA	ETVKLQFD	NSTRSNAQ	NAPPWV	MVGGSYSGALT	AWTE	SVAPGT	FWAY	HATSAPVEAIY												
<i>Aspergillus_flavus</i>	TLEQS	I	LDTLTHFA	ETVKQLE	FTDSNS	SNAPKAPWV	LVGGSYSGALA	AWTA	AVAPGT	FWAY	HATSAPVQAID											
<i>Aspergillus_aculeatus</i>	TLEQS	V	LDLTYFA	ENVKLGFD	NSTSSNAP	HVPWV	LVGGSYSGALT	AWTE	HLAPGT	FWAY	HATSAPVESIY											
<i>Rasamsoni_emersonii</i>	TIKQS	I	DLTYFA	KTVKL	PFDRN	GSNAD	KAPWV	LSGGSYSGAL	SAWTAST	SPGT	FWAY	HASSAPVEAIY										
	210	220	230	240	250	260	270															
<i>Aspergillus_niger</i> (PEP)	DYWQYF	YPI	QQGMA	QNCSKD	VSLVAEY	VDKIG	GNKTAKE	EQQ	QKEL	FGLG	AVEHFDDFAAVLPNGPYLWQ											
<i>Aspergillus_carbonarius</i>	DFWQYF	YPI	QQGMA	QNCSKD	VSRVAE	HVDKVG	KSGTAEE	QQ	QKEL	FGLG	ALEHYDDFAAVLPNGPYLWQ											
<i>Aspergillus_flavus</i>	DFWQYF	YPI	RHGM	MAPNC	RSRVANH	IDTVG	RNGSAAD	Q	QKEL	FGLG	LEALEHYDDFAAAALPTGPNGPYLWQ											
<i>Aspergillus_aculeatus</i>	DFWQYF	YPI	QDGMA	AKNC	SKDVS	VAEHDV	KIGKTGT	KAQQ	TEL	KKLF	GLEALEHFDDFAAVLP											
<i>Rasamsoni_emersonii</i>	DYWQYF	APV	QDGLP	ANC	SKDLSR	VVDYIDS	VLS	QSGNATA	KQQL	KDLF	GLG	ALEHDDFA	SALENGPWLWQ									
	280	290	300	310	320	330	340															
<i>Aspergillus_niger</i> (PEP)	DND	FATG	YSSFFQ	FCDAVE	VEAGAA	VT	PGP	EGVG	GLEK	ALAN	YANWFNST	ILFDYCAS	YGTDE	WSVAC								
<i>Aspergillus_carbonarius</i>	DND	FATG	YSEFFQ	FCDAVE	VGVEAGAA	VT	PGP	EGVG	GLEK	ALAN	YANWFNST	ILPNYCAS	YGTDE	WSVAC								
<i>Aspergillus_flavus</i>	SNTF	VTVG	YNSFFA	FCDAVE	NEAGAA	VPPG	PEGV	GLQ	KALT	GYANWF	NSTI	IPGCAS	YGTDE	RTVAC								
<i>Aspergillus_aculeatus</i>	DNTF	FATG	YSDFFA	FCDAVE	NEAGAA	VT	PG	AEVG	GLEK	ALAN	YANWF	NEI	IPPGYCAS	YGTDE	SVAC							
<i>Rasamsoni_emersonii</i>	SNSF	YDP	YPVV	YEFCD	YVENAYA	SPV	VAAG	PDGV	GLEK	ALSGY	ATWWNK	VFFPG	CATGY	YGTWS	SDNSIAC							
	350	360	370	380	390	400	410															
<i>Aspergillus_niger</i> (PEP)	FDSYNA	SSP	IYTD	TSVGN	NAVDRQ	WEFL	LCNEP	FFF	XWQD	GAP	EGT	STIVP	RLV	SASYW	QRQCPL	YF	PETNG					
<i>Aspergillus_carbonarius</i>	FDSYNA	SSPL	FTDT	TSVD	NAVDRQ	WEFL	LCNEP	FFF	WWQD	GAP	EDV	TTIVP	RLV	NAEY	WQRQC	CSLY	F	PETNG				
<i>Aspergillus_flavus</i>	FDTHNP	SSA	I	FTDT	TSVD	NAVDRQ	WQWFL	LCNEP	FFF	WWQD	GAP	EGV	PTIVP	RTINA	EY	WQRQC	CSLY	F	PEVNG			
<i>Aspergillus_aculeatus</i>	YDTYNTT	SSL	FTDT	TSVD	NAVDRQ	WQWFL	LCNEP	FFF	WWQD	GAP	SET	TTIVP	RLV	SADY	WQRQC	ALY	F	PEVNG				
<i>Rasamsoni_emersonii</i>	FDTY	NQSSPM	FTDLS	VNSNT	I	NRQWN	WFLCNEP	FFF	WWQD	GAP	KNVPS	I	VSRLV	TAEY	WQRQC	PL	FF	PEEDG				
	420	430	440	450	460	470	480															
<i>Aspergillus_niger</i> (PEP)	YT	YGS	AKG	KNAA	ATV	N	SWTGG	WD	MTR	NT	TRLI	WTNG	QYD	PWRD	SGV	STFR	PGQL	V	I	PGGF		
<i>Aspergillus_carbonarius</i>	YT	YGS	AKG	KNTA	ATV	N	WTG	WF	ETR	NT	TRLI	WTNG	QYD	PWRD	SGV	STFR	PGQL	STADE	PFVQ	I	PGGF	
<i>Aspergillus_flavus</i>	YT	YGS	AKG	KTA	ATV	N	WTG	WFS	DSK	N	TRLI	WTNG	QYD	PWRD	SGV	STFR	PGQL	STADE	PFVQ	I	PGGF	
<i>Aspergillus_aculeatus</i>	YT	YGS	AKG	KSNT	ATF	N	WTG	WFM	MNG	N	TRLI	WTNG	QYD	PWRD	ATV	STFR	PGQL	LASTP	SEPVQ	I	PGGF	
<i>Rasamsoni_emersonii</i>	YT	YGS	AKG	KTA	ADV	N	WTG	WFL	LT	-	NT	TRLI	WTNG	QYD	PWRD	ATV	STFR	PGQL	QSTP	QAPLQ	I	PEGV
	490	500	510	520																		
<i>Aspergillus_niger</i> (PEP)	HCS	DLYM	ADYY	ANEGV	VKK	VVD	NEV	KQ	I	KEW	VEE	YYA-										
<i>Aspergillus_carbonarius</i>	HCS	DLYM	ADYY	ANAGV	VKR	VVD	NEV	AQ	I	KWV	AE	YYA-										
<i>Aspergillus_flavus</i>	HCS	DLYM	ADYY	ANAGV	VKR	VVD	NEV	AQ	I	KWV	AE	YYA-										
<i>Aspergillus_aculeatus</i>	HCS	DLYM	ISD	SV	NNAGV	VKK	VVD	NEV	AQ	I	KWV	AE	YYA-									
<i>Rasamsoni_emersonii</i>	H	CDL	I	L	KNA	E	ANAGV	Q	V	R	V	V	NEY	RK								

Fig. 2