

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 650**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/415** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.03.2014 PCT/PT2014/000017**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14148931**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2014 E 14715461 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2019 EP 2976356**

54 Título: **Proteasas aspárticas**

30 Prioridad:

**19.03.2013 GB 201305025**

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

**29.05.2020**

73 Titular/es:

**BIOCANT - ASSOCIAÇÃO DE TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA (100.0%)**

**Centro de Inovacao em Biotecnologia Biocant  
Park Parque Tecnologia de Cantanhede Nucleo  
04., Lote 3  
Cantanhede 3060-197, PT**

72 Inventor/es:

**ALMEIDA, CARLA SOFIA GOMES MALAQUIAS  
DE;  
SIMÕES, ISAURA ISABEL GONÇALVES y  
FARO, CARLOS JOSÉ FIALHO COSTA**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 763 650 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

Proteasas aspárticas

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a proteasas aspárticas y en particular a cardosina B recombinante.

10 **Antecedentes de la invención**

10

Las proteasas aspárticas son peptidasas presentes en animales, plantas, hongos y virus y presentan una amplia gama de funciones y actividades, incluyendo: digestión de mamíferos, por ejemplo, quimosina y pepsina A, activación y degradación de hormonas polipeptídicas y factores de crecimiento, por ejemplo, catepsina D, regulación de la tensión arterial, por ejemplo, renina, degradación de la hemoglobina por parásitos, por ejemplo, plasmepsinas, procesamiento proteolítico de la poliproteína del VIH, por ejemplo, retropepsina, participación en interacciones polen-pistilo en plantas, por ejemplo, cardosina A.

15

20

Las proteasas aspárticas se sintetizan como preproenzimas y contienen un péptido señal, que se escinde dando como resultado una proenzima que puede secretarse y activarse de manera autocatalítica. En general, las proteasas aspárticas consisten en una sola cadena peptídica de aproximadamente 320-360 restos de aminoácidos, compuesta principalmente por estructuras de cadena  $\beta$  dispuestas en dos lóbulos. El sitio catalítico de la enzima está ubicado entre estos dos lóbulos, conteniendo cada uno un resto de aspartato que están dentro de la distancia de formación de enlace de hidrógeno entre sí y actúan juntos para activar una molécula de agua, lo que da como resultado la escisión del enlace peptídico del sustrato (a través de ataque nucleófilo).

25

30

Las proteasas aspárticas vegetales difieren de otras proteasas aspárticas en que comprenden un inserto específico vegetal que se escinde durante la maduración de proteínas, además de un péptido señal (responsable de la translocación al RE); un prosegmento de 40-50 restos de aminoácidos (implicado en el correcto plegamiento, estabilización y clasificación de la enzima); y una enzima madura que posee dos motivos de secuencia catalíticos. Los dos restos de aspartato catalítico en proteasas aspárticas vegetales están contenidos dentro de los motivos Asp-Thr-Gly y Asp-Ser-Gly. Con algunas excepciones, la mayoría de las proteasas aspárticas vegetales identificadas hasta ahora se sintetizan con un preprodominio y posteriormente se convierten en enzimas maduras de dos cadenas. El procesamiento proteolítico de las proteasas aspárticas vegetales comienza con la eliminación de la secuencia señal tras la translocación a la luz del RE. Las siguientes etapas de conversión incluyen la escisión del prosegmento y la eliminación total o parcial del dominio interno de PSI para producir formas maduras de dos cadenas de las enzimas. En la forma madura de dos cadenas, ambas cadenas polipeptídicas se mantienen unidas por interacciones hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno (véase Simões y Faro (2004)<sup>3</sup>).

35

40

*Inserto específico vegetal (PSI)*

Muchas proteasas aspárticas vegetales difieren de sus homólogos de mamíferos y microbianos por la presencia de un inserto específico vegetal (PSI) que se escinde durante la maduración de proteínas para dar lugar a la enzima madura de dos cadenas. El PSI normalmente tiene aproximadamente 104 aminoácidos. En fitepsina, de cebada, la eliminación del PSI condujo a la secreción de la fitepsina mutada cuando se expresó en protoplastos de tabaco, conservando al mismo tiempo la actividad enzimática<sup>4</sup>. Se mostró que la presencia de PSI era al menos necesaria para la clasificación vacuolar<sup>4</sup>. Se ha mostrado que el PSI de cardosina A es un inductor de filtración de vesículas<sup>18</sup>.

45

*Clasificación vacuolar*

50

El destino final de una proteína después de la síntesis es un proceso muy complejo y regulado y generalmente depende de la presencia de información específica de direccionamiento (por ejemplo, señales de clasificación, modificaciones postraduccionales) que es reconocida específicamente por receptores que dirigen proteínas nacientes a sus localizaciones finales en la célula<sup>1</sup>.

55

60

Una de las vías biosintéticas más complejas es la ruta secretora. De una manera muy simplificada, este sistema comprende varios compartimentos subcelulares unidos a membrana y se intercambian proteínas entre estos compartimentos mediante transporte de vesículas. Proteínas residentes en el retículo endoplásmico (RE), aparato de Golgi, vacuolas o membrana plasmática/matriz extracelular tienen que entrar en este sistema endomembranoso y algunas de ellas experimentan modificaciones de procesamiento y postraduccionales a lo largo de su paso a través de la red del RE y Golgi. El direccionamiento a RE se determina de manera cotraducciona por la presencia de un péptido señal en el extremo N de una proteína naciente<sup>1</sup>. Aunque las pruebas recientes indican que el sistema puede ser más complejo de lo esperado al principio<sup>2</sup>, todavía se acepta en general que las proteínas se clasifican activamente en vacuolas, lo que significa que contienen señales de clasificación vacuolar específicas (VSS).

65

Se han identificado diferentes tipos de señales de clasificación vacuolar (VSS)<sup>1,3</sup>. Aunque todavía no se ha definido una secuencia de consenso para estas señales, actualmente se dividen en tres categorías: VSS específicas de

secuencia (ssVSS) que comprenden propéptidos N-terminales (por ejemplo, esporamina) o secuencias internas (por ejemplo, ricina); propéptidos C-terminales (CTPP) (por ejemplo, lectina y quitinasa) y VSS de estructura física (psVSS) [por ejemplo, inserto específico vegetales (PSI) de fitepsina]<sup>3</sup>. Dado el número de proteínas vacuolares solubles que carecen de estos tipos de VSS, se espera que aún deban identificarse nuevos motivos para la clasificación vacuolar.

La capacidad de manipular la clasificación de proteínas es particularmente importante si se considera la expresión de proteínas de alto valor en sistemas heterólogos u homólogos. La clasificación específica de una proteína seleccionada en vacuolas de almacenamiento puede ser muy ventajosa para la acumulación de grandes cantidades de proteínas recombinantes y, de este modo, aumentan el valor alimenticio de una planta. Por el contrario, la redirección de una proteína vacuolar nativa para la secreción puede ser en particular útil considerando, por ejemplo, la expresión en sistemas heterólogos como levaduras donde la secreción de proteínas en los medios facilita en gran medida la manipulación y purificación de proteínas recombinantes.

La relevancia de estas señales de clasificación vacuolar en diversas aplicaciones se confirma mediante diferentes patentes expedidas: US69723504, US73686285, US53607266 y US60546377, donde las dos últimas describen las VSS de lectina y quitinasa, respectivamente.

Las proteasas aspárticas normales están ampliamente distribuidas en plantas y se han purificado de diversos tejidos. En general, estas enzimas comparten altos niveles de identidad de secuencia de aminoácidos (más del 60 %) y la mayoría de ellas se acumulan dentro de vacuolas de las plantas. Sin embargo, hay excepciones a esta localización intracelular y se mostró que varias proteasas aspárticas vegetales son extracelulares<sup>8</sup>.

Las proteasas aspárticas vegetales se han usado en la fabricación de queso durante muchos años. De hecho, esta es una de las primeras aplicaciones de enzimas en el procesamiento de alimentos, desde aproximadamente 6000 AC (véase Fox y McSweeney 1999 citado en Claverie-Martin y Vega-Hernandez (2007)<sup>19</sup>). Se han añadido extractos vegetales, incluyendo flores secas, a la leche para actuar como coagulante. Aunque se han realizado esfuerzos para producir proteasas aspárticas vegetales recombinantes, estas aún no están disponibles en el mercado debido a los grandes volúmenes de cultivo o al alto número de etapas de cultivo para obtener una cantidad significativa de proteína recombinante.

### Sumario de la invención

La presente invención es como se define en las reivindicaciones.

Los inventores han determinado que la función de VSS normal del inserto específico vegetal (PSI) de ~100 aminoácidos se puede inactivar mediante manipulación de ADN recombinante para potenciar la secreción de proteasas aspárticas vegetales en sistemas de expresión homólogos o heterólogos (preferentemente sistemas de expresión heterólogos, no vegetales), conservando al mismo tiempo la actividad de proteasa aspártica de la proteína secretada. Por tanto, los inventores han proporcionado un medio novedoso y ventajoso para producir grandes volúmenes de proteasas aspárticas vegetales en una forma que es conveniente para aislar y purificar.

En consecuencia, la presente divulgación proporciona métodos para la expresión en células de proteasas aspárticas vegetales mutantes modificadas de modo que se inactive el dominio de PSI, estando la expresión preferentemente en células eucariotas no vegetales. Preferentemente, las proteasas aspárticas vegetales mutantes conservan su actividad proteasa.

Por lo tanto, la presente invención proporciona una proteasa aspártica vegetal que se modifica para que carezca de un dominio de inserto específico vegetal (PSI). El dominio de PSI se suprime por completo. El dominio de PSI puede ser reemplazado completamente con un conector, tal como un conector de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más restos de aminoácidos. Los aminoácidos del conector pueden ser todos iguales, por ejemplo, pueden ser todos restos de glicina. Como alternativa, el conector puede comprender una pluralidad de aminoácidos diferentes. Sin embargo, este conector no comprende todos, o sustancialmente todos, los restos de aminoácidos del dominio de PSI funcional. La modificación del dominio de PSI puede conferir transporte alterado a la proteasa aspártica vegetal. Por ejemplo, el transporte de la proteasa aspártica vegetal dentro de una célula puede modificarse en comparación con el transporte de una proteasa aspártica vegetal que no tiene un dominio de PSI modificado, tal como una proteasa aspártica vegetal de tipo silvestre. Las proteasas aspárticas vegetales según la invención tienen actividad caseinolítica.

La proteasa aspártica vegetal según la invención puede tener un segmento pro. El extremo N de la proteasa aspártica vegetal puede no modificarse con respecto a, o ser diferente a, proteasa aspártica vegetal de tipo silvestre.

La proteasa aspártica vegetal según la invención puede modificarse en el extremo C.

La proteasa aspártica vegetal de la invención es cardosina B.

En algunos casos, la proteasa aspártica vegetal según la invención tiene al menos 95 % o al menos 98 % de identidad con la SEQ ID NO: 1.

5 Una proteasa aspártica vegetal según la invención puede haberse expresado en una célula eucariota. Por ejemplo, la proteasa aspártica vegetal puede haberse expresado en una célula de levadura, por ejemplo, una célula de *Kluyveromyces lactis*. En algunos casos, la proteasa aspártica vegetal según la invención no se ha producido en un protoplasto vegetal. En algunos casos, la proteasa aspártica vegetal no se ha producido en *E. coli*.

10 La invención también proporciona ácido nucleico que codifica una proteasa aspártica vegetal según la invención. Por ejemplo, ácido nucleico que codifica una proteasa aspártica vegetal que carece de un dominio de PSI; un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 o un polipéptido que tiene al menos 98 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, en donde el polipéptido carece de un dominio de inserto específico vegetal (PSI). También se proporciona un vector que comprende el ácido nucleico, por ejemplo, un vector de expresión de levadura.

15 También se proporciona una célula que codifica una proteasa aspártica vegetal según la invención. La célula puede tener un genoma modificado para codificar la proteasa aspártica vegetal o puede incluir un vector que codifique la proteasa aspártica vegetal. La célula puede tener ácido nucleico, por ejemplo, su genoma puede modificarse para incluir ácido nucleico, que codifica una proteasa aspártica vegetal que carece de un dominio de PSI; el polipéptido de la SEQ ID NO: 1 o un polipéptido que tiene al menos 98 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, en donde el polipéptido codificado carece de un dominio de inserto específico vegetal (PSI). La célula puede ser una célula de levadura, tal como *Kluyveromyces lactis*.

20 La divulgación también proporciona un método para producir una proteasa aspártica vegetal en la que una célula, preferentemente una célula que no es una célula vegetal, o un protoplasto vegetal, o una *E. coli*, que expresa una proteasa aspártica vegetal que carece de un dominio de inserto específico vegetal funcional (PSI).

25 En algunos métodos, la proteasa aspártica vegetal se secreta de la célula y el método puede comprender recoger la proteasa aspártica vegetal que se ha secretado de la célula, por ejemplo, dividiendo la proteasa aspártica vegetal secretada de otros componentes secretados de la célula o contenidos de otro modo dentro de los medios en los que las células están creciendo. El método puede comprender expresar la proteasa aspártica vegetal a partir de un vector contenido dentro de la célula o del genoma de la célula. La célula puede ser una célula eucariota. La célula puede ser una célula fúngica, tal como una célula de levadura, por ejemplo, *Kluyveromyces lactis*.

30 Las proteasas aspárticas vegetales según la invención pueden usarse en el cuajado o la coagulación de la leche, por ejemplo, para su uso en la fabricación de queso. Por tanto, la invención proporciona además métodos para cuajar o coagular la leche y/o para hacer queso.

35 La divulgación proporciona además un método para promover la acumulación de un polipéptido de interés en la vacuola de una célula. El método puede comprender expresar una construcción polipeptídica en la célula, comprendiendo la construcción polipeptídica una secuencia de aminoácidos que codifica la proteína de interés unida covalentemente con una secuencia de aminoácidos que codifica un dominio de PSI. Por ejemplo, el dominio de PSI de cardosina A. El dominio de PSI puede tener al menos 70 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4. También se proporcionan vectores que comprenden dichas construcciones, junto con células que incluyen dichos vectores o células que han sido modificadas por dichos vectores para expresar la construcción de proteína a partir de su genoma.

#### Descripción de realizaciones preferidas

50 La invención incluye la combinación de los aspectos y características preferidas descritos, excepto cuando dicha combinación sea claramente inaceptable o se evite de manera expresa.

Los encabezados de sección usados en el presente documento tienen fines organizativos solamente y no deben interpretarse como limitantes de la materia objeto descrita.

55 Ahora se ilustrarán aspectos y realizaciones de la presente invención, a modo de ejemplo, con referencia a las figuras adjuntas. Aspectos y realizaciones adicionales resultarán evidentes para los expertos en la materia.

#### Breve descripción de las figuras

60 Las realizaciones y experimentos que ilustran los principios de la invención se analizarán ahora con referencia a las figuras adjuntas en las que:

**Figura 1.** Electroforesis en gel de SDS-PAGE de enzima purificada de *K. lactis* (pCBΔPSI).

65 **Figura 2.** Secuencias de cardosinas B y A con y sin secuencia de PSI, secuencias de PSI y secuencias usadas

en los ejemplos.

**Figura 3.** Quesos de oveja, cabra y vaca producidos usando VRen como agente de cuajado de la leche.

5 **Figura 4.** Análisis de RP-HPLC de productos de digestión de  $\alpha$ -caseína. La digestión por cardosina B nativa (nCB) se muestra en negro, mientras que la digestión por cardosina B recombinante se muestra en gris.

**Figura 5.** Representación esquemática de diferentes construcciones de cardosina A. A) Representación de la estructura primaria de cardosina A. B) Representación esquemática de mutantes de cardosina A.

10 **Figura 6.** Análisis por SDS-PAGE de hidrólisis de K-caseína por mutantes de cardosina A. La actividad enzimática hacia la K-caseína se probó a 37 °C durante 2 horas.

15 **Figura 7.** Alineación de secuencias de aminoácidos parciales de construcciones de cardosina B. Las secuencias corresponden a las regiones de PSI/conectoras de cada construcción.

**Figura 8.** Análisis de transferencia de Western de mutantes de cardosina B secretados. Las muestras activadas (36  $\mu$ l) de diez clones seleccionados al azar de cada construcción se examinaron usando un anticuerpo específico contra cardosina B).

20 **Figura 9.** Patrón de SDS-PAGE de K-caseína hidrolizada por diferentes construcciones de cardosina B. K-caseína (6  $\mu$ g) se incubó a 37 °C, durante 20 minutos con una muestra (1  $\mu$ l) de cada mutante de cardosina B. Se realizó un control negativo en un experimento paralelo, incubando K-caseína con sobrenadante de cultivo (1  $\mu$ l) de células de levadura no transformadas (C-).

25 **Figura 10.** Actividad de cuajado de la leche de mutantes de cardosina B. La actividad de cuajado de la leche se determinó mezclando una solución de leche desnatada (12 %) preparada en CaCl<sub>2</sub> 10 mM con las enzimas recombinantes activas. Se probaron los mismos diez clones seleccionados al azar analizados en transferencia de Western y escisión de k-caseína para determinar la actividad de cuajado de la leche. Las incubaciones se realizaron a 37 °C y el tiempo de cuajado de la leche se determinó mediante observación visual. Los clones de la misma construcción con tiempos de cuajado de la leche similares están representados solo por un punto.

30 **Figura 11.** Sumario del estudio de construcción de cardosina B - se seleccionó un clon de cada construcción y se repitieron experimentos tanto de k-caseína como de transferencia de Western para obtener una figura resumida de este estudio.

### Descripción detallada de la invención

40 Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en la descripción adjunta a continuación, incluyendo detalles específicos del mejor modo contemplado por los inventores para llevar a cabo la invención, a modo de ejemplo. Será evidente para un experto en la materia que la presente invención se puede practicar sin limitación a estos detalles específicos.

#### *Cuajado de la leche y fabricación de queso*

45 El uso de proteasas aspárticas (Aps) en la fabricación de queso es una de las primeras aplicaciones de enzimas en el procesamiento de alimentos<sup>17</sup>.

50 El cuajado de leche enzimática es un proceso de dos fases. La etapa uno implica la hidrolización del enlace Phe<sup>105</sup>-Met<sup>106</sup> de k-caseína bovina, dividiendo la molécula de proteína en dos partes - para-k-caseína (hidrófoba) y el macropéptido (hidrófilo). En la segunda fase, las micelas de para-k-caseína (que se desestabilizaron durante la proteólisis) se coagulan.

55 Como se usa en el presente documento, el término "cuajar" se usa indistintamente con "coagular".

60 La quimosina, extraída del abomaso de terneros lactantes, es específica para k-caseína. Sin embargo, Aps presentes en extractos de plantas escinden  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ -caseínas. Esto provoca acidez excesiva, amargor y defectos de textura en el queso, pero estas características son responsables del sabor, olor y consistencia especiales de las variedades de queso producidas usando estas enzimas.

65 Los métodos de preparación de queso pueden implicar añadir una enzima coagulante tal como una proteasa aspártica vegetal para inducir coagulación, separar la leche en cuajada sólida y suero líquido. Se puede usar una pluralidad de enzimas diferentes, por ejemplo, Cardosina A y Cardosina B. La pluralidad de diferentes enzimas se puede obtener de diferentes fuentes, por ejemplo, una proteasa aspártica vegetal y una proteasa aspártica de origen animal. Como alternativa, las enzimas se pueden obtener de la misma fuente. Las cuajadas se separan del suero. Puede usarse "corte" para potenciar la separación de la cuajada del suero, aumentando el área superficial de la

cuajada. Se puede añadir sal. Después se prensa la cuajada, con frecuencia en un molde, para promover aún más la separación de la cuajada del suero. Después, la cuajada prensada opcionalmente se envuelve y se deja madurar para formar el queso maduro.

- 5 Las proteasas aspárticas vegetales de la presente invención son adecuadas para la coagulación de la leche y/o para la fabricación de queso porque pueden producirse fácilmente *in vitro*, aún conservan su especificidad por  $\kappa$ -caseína y su capacidad para cuajar la leche.

#### *Proteasas aspárticas vegetales*

- 10 En la presente memoria descriptiva, una "proteasa aspártica vegetal" se refiere e incluye proteasas aspárticas que pueden obtenerse a partir de células o tejidos vegetales, incluyendo plantas enteras. Las proteasas aspárticas vegetales incluyen cardosinas, ciprosinas, cenprosinas, fitepsinas y cinarasas. La proteasa aspártica vegetal de la invención es cardosina B recombinante. Como se usa en el presente documento, la expresión "proteasa aspártica vegetal" incluye mutantes de dichas proteasas, en particular mutantes en los que el dominio de PSI se ha vuelto no funcional. Se prefiere que la mutación no inactive la función de proteasa aspártica de la proteína. En realizaciones preferidas, la mutación es tal que el polipéptido resultante conserva al menos el 50 %, más preferentemente uno de al menos 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la proteasa aspártica de tipo silvestre.

- 20 La expresión "proteasa aspártica vegetal modificada" como se usa en el presente documento describe una proteasa aspártica vegetal que contiene una o más modificaciones en comparación con una proteasa aspártica vegetal de tipo silvestre. Por ejemplo, puede contener una o más supresiones, sustituciones o adiciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de la proteasa aspártica vegetal producida en una planta.

Las cardosinas son ejemplos de proteasas aspárticas vegetales, obtenidas de cardo (*Cynara cardunculus*). Se conoce la secuencia de aminoácidos de cardosina A y cardosina B (véase las SEQ ID NO: 5 y 6).

- 30 Los inventores han desarrollado un método de producción heterólogo para proteasas aspárticas vegetales en una levadura GRAS (*K. lactis*) que podría transferirse eficazmente a producción a gran escala. Han utilizado el sistema de expresión de proteínas de *K. lactis* de New England Biolabs y se llevaron a cabo varios procedimientos de optimización para potenciar los niveles de expresión y secreción de proteínas. Cardosina A y cardosina B (una proteasa aspártica vacuolar y una extracelular de cardo (*Cynara cardunculus*), respectivamente) se usaron como modelos de trabajo.

- 40 Aunque algunos mecanismos de transporte en plantas parecen ser similares a los de levaduras, existen varias variaciones, en particular, con respecto a la presencia en plantas de múltiples tipos de vacuola, que podrían dar como resultado la falta de reconocimiento de las VSS de proteasa aspártica por los receptores de clasificación vacuolar de levadura. De hecho, se ha mostrado previamente que otras VSS vegetales del tipo CTPP no se reconocían en levadura<sup>9</sup>. Por el contrario, los resultados descritos en el presente documento indican que algunas VSS identificadas en proteasas aspárticas vegetales son reconocidas por mecanismos de transporte de levadura y pueden usarse para dirigir la clasificación de proteínas. Estos resultados muestran que el dominio de PSI es funcional en plantas y levaduras.

#### *Inserto específico vegetal (PSI)*

- 50 Cuando los inventores generaron una construcción de cardosina B (que normalmente se localiza extracelularmente), que carece del dominio PSI y lo expresó en la levadura *K. lactis*, se observaron niveles mayores de expresión y secreción en ausencia del PSI, en comparación con la construcción de tipo silvestre de longitud completa. Estos resultados demuestran que la eliminación del dominio de PSI de todas las proteasas aspárticas vegetales (ya sea vacuolares o secretadas) puede tener una influencia positiva en su secreción, en levaduras o en plantas.

- 55 El PSI es una inserción de aproximadamente 100 aminoácidos ubicados entre el dominio N-terminal y un dominio C-terminal de las "preproenzimas" precursoras de la mayoría de las proteasas aspárticas vegetales identificadas hasta ahora. El PSI solo se identifica en proteasas aspárticas vegetales y es muy similar a las saposinas y proteínas de tipo saposina, cuya función biológica no se ha establecido completamente. Estructuralmente, el PSI comprende cinco hélices  $\alpha$  anfipáticas plegadas en un dominio globular compacto y unidas entre sí por tres enlaces disulfuro (analizado en Simoes y Faro 2004<sup>3</sup>). La secuencia de PSI no muestra homología con proteasas aspárticas de mamíferos o microbianas, pero es muy similar a la de proteínas de tipo saposina (SAPLIP). Una característica única del PSI es el intercambio de las partes N y C-terminales del dominio de tipo saposina, donde la parte C-terminal de una saposina está unida a la parte N-terminal de la otra saposina. Por lo tanto, el PSI no es una verdadera saposina sino una swaposina.

- 65 Las proteasas aspárticas vegetales descritas en el presente documento pueden carecer de un dominio de PSI funcional. El dominio de PSI puede suprimirse total o parcialmente o mutarse de tal manera que se vuelva no

funcional. La mutación puede implicar la modificación de una secuencia oligonucleotídica que codifica la proteasa aspártica. Por ejemplo, la modificación puede ser una adición, supresión, inserción o sustitución en la secuencia codificante.

5 Un dominio de PSI puede tener identidad sustancial con las SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4. Un dominio de PSI puede tener al menos 70 % de identidad, al menos 75 % de identidad, al menos 80 % de identidad, al menos 85 % de identidad, al menos 90 % de identidad, al menos 95 % de identidad, al menos 98 % de identidad o 100 % de identidad con las SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

10 El dominio de PSI puede tener una longitud de uno cualquiera de 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149 o 150 aminoácidos. El dominio de PSI puede tener una longitud en el intervalo de 80 a 120 aminoácidos, o de 15 90 a 110 aminoácidos, o de 95 a 105 aminoácidos o de 98 a 108 aminoácidos. El dominio de PSI puede tener una longitud mínima de aproximadamente 80 aminoácidos, más preferentemente uno de 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105 o 106 aminoácidos. El dominio de PSI puede tener una longitud máxima de aproximadamente 130 aminoácidos, más preferentemente uno de 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 20 127, 128 o 129 aminoácidos.

El dominio de PSI de una proteasa aspártica vegetal actúa para regular el transporte de cardosinas en la célula, por ejemplo, dirigiendo la proteína a la vacuola. Por tanto, las proteasas aspárticas vegetales según la divulgación, que carecen de un dominio de PSI funcional tienen transporte alterado, por ejemplo, en comparación con proteasas aspárticas vegetales que contienen un dominio de PSI completo. Por ejemplo, una proteasa aspártica modificada que carece de un dominio de PSI funcional puede no estar dirigida a la vacuola, mientras que la proteasa aspártica no modificada, tal como la proteína de tipo silvestre, podría estar dirigida a la vacuola.

25

La persona experta puede determinar fácilmente si una proteasa aspártica carece de un dominio de PSI funcional mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, se pueden aplicar agentes que se sabe que afectan al transporte de proteínas (por ejemplo, glucosidasas) a una célula para determinar si el transporte de la proteasa aspártica modificada se ve afectado por el agente de la misma manera o de manera similar a la proteasa aspártica vegetal completa o de tipo silvestre. Como alternativa, o además, puede usarse fraccionamiento subcelular para determinar si las proteasas aspárticas modificadas y completas, o de tipo silvestre, están presentes en una 30 distribución similar dentro de una célula. Como alternativa, o además, puede usarse inmunocitoquímica para determinar si la proteína es secretada por la célula o si está presente en un compartimento celular diferente, a una proteasa aspártica vegetal completa, o de tipo silvestre.

35

La falta de un dominio de PSI funcional puede ser suficiente para detener la recogida de proteasa aspártica vegetal en la vacuola y/o para aumentar la secreción de la proteasa aspártica vegetal de la célula. En algunos casos, la falta de un dominio de PSI funcional puede evitar por completo que la proteasa aspártica vegetal se localice en la vacuola de manera que sustancialmente toda la proteasa aspártica vegetal producida por la célula sea secretada por la célula.

40

El ácido aspártico vegetal que carece de un dominio de PSI funcional puede ser cualquier ácido aspártico vegetal. Preferentemente, el ácido aspártico vegetal es de la familia de cardosina de proteasas aspárticas vegetales, es decir, una cardosina mutante o modificada que carece de un dominio de PSI funcional. En algunos casos, la proteasa aspártica vegetal puede mutarse adicionalmente.

45

La modificación del dominio de PSI para que no sea funcional puede afectar a las propiedades cinéticas de la proteasa aspártica vegetal. Por ejemplo, la proteasa aspártica vegetal modificada puede ser menos caseinólítica en comparación con la proteasa aspártica vegetal de origen natural o de tipo silvestre. En algunos casos, la modificación del PSI puede aumentar la especificidad de la proteasa aspártica vegetal por un sustrato. Por ejemplo, puede aumentar la especificidad de la proteasa aspártica vegetal por  $\alpha$ -caseína.

50

55 *Segmento pro*

El prosegmento se ubica en el extremo N de proteasas aspárticas vegetales. Está presente en la proteína precursora y normalmente se elimina por proteólisis durante la producción de la enzima activa, madura, del zimógeno inactivo. En algunos casos, las proteasas aspárticas vegetales según la divulgación se expresan con un prosegmento. El prosegmento comprende aproximadamente 44 aminoácidos.

60

*Secuencia C-terminal*

La secuencia C-terminal es una señal de clasificación de enzimas potencial. Determinadas proteasas aspárticas vegetales pueden carecer de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 restos de aminoácidos, preferentemente 4 aminoácidos, del

extremo C, en comparación con la forma de origen natural de la proteasa aspártica. Por ejemplo, la cardosina A modificada según la divulgación puede carecer de AEAA del extremo C y la cardosina B puede carecer de AEAV.

#### *Conectores*

5 Como se usa en el presente documento, el término "conector" denota una serie de restos de aminoácidos que se introducen en una secuencia proteica para reemplazar los restos de aminoácidos que se han eliminado. Por ejemplo, las proteasas aspárticas vegetales de la presente divulgación carecen de un dominio de PSI funcional. Cuando el dominio de PSI se elimina total o parcialmente de la proteasa aspártica vegetal de la divulgación, los aminoácidos  
10 eliminados pueden ser reemplazados por un conector. El conector puede permitir que dos o más regiones de la proteína que lo contiene se plieguen en la configuración tridimensional correcta.

15 El conector puede comprender uno o más aminoácidos. Los aminoácidos pueden ser todos iguales, por ejemplo, una pluralidad de restos de glicina. Como alternativa, los aminoácidos pueden ser diferentes. El conector puede comprender una secuencia correspondiente a una secuencia mezclada del dominio de PSI.

20 El conector puede comprender entre 1 y 100, entre 1 y 50, entre 1 y 25 o entre 1 y 10 aminoácidos. El conector puede comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos. En algunos casos, el conector consta de 1 a 7 restos de aminoácidos.

25 La presencia de un conector puede afectar a las propiedades cinéticas de la proteasa aspártica vegetal. Por ejemplo, la introducción de un conector puede hacer la proteasa aspártica vegetal menos caseinolítica en comparación con la proteasa aspártica vegetal de origen natural o de tipo silvestre. En algunos casos, el conector puede aumentar la especificidad de la proteasa aspártica vegetal por un sustrato. Por ejemplo, la introducción de un conector puede aumentar la especificidad de la proteasa aspártica vegetal por  $\alpha$ -caseína.

#### *Cardosinas*

30 En la presente memoria descriptiva, un ácido nucleico de cardosina puede ser cualquier ácido nucleico (ADN o ARN) que tenga una secuencia de nucleótidos que codifique un polipéptido que tenga un grado específico de identidad de secuencia con una de las SEQ ID NO: 5 y 6, con un transcrito de ARN de una cualquiera de estas secuencias, con un fragmento de una cualquiera de las secuencias anteriores o con la secuencia complementaria de una cualquiera de estas secuencias o fragmentos. Como alternativa, un ácido nucleico de cardosina puede ser uno que hibrida con una de estas secuencias en condiciones de rigurosidad alta o muy alta. El grado especificado de identidad de  
35 secuencia puede ser de al menos 60 % a 100 % de identidad de secuencia. Más preferentemente, el grado especificado de identidad de secuencia puede ser uno de al menos 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad.

40 En la presente memoria descriptiva, un polipéptido de cardosina puede ser cualquier péptido, polipéptido o proteína que tenga una secuencia de aminoácidos que tenga un grado específico de identidad de secuencia con una de las SEQ ID NO: 1, 2, 5 o 6 o con un fragmento de una de estas secuencias. La cardosina puede ser, o tener un grado específico de identidad de secuencia con, cardosina A depositada en GenBank con el número de referencia Q9XFX3.1 (GI: 75267434). La cardosina puede ser, o tener un grado específico de identidad de secuencia con, cardosina B depositada en GenBank con el número de referencia Q9XFX4.1 (GI: 75338567).  
45

50 El grado especificado de identidad de secuencia puede ser de al menos 60 % a 100 % de identidad de secuencia. Más preferentemente, el grado especificado de identidad de secuencia puede ser uno de al menos 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad.

#### *Identidad de secuencia*

55 El porcentaje (%) de identidad de secuencia se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos en la secuencia enumerada dada después de alinear las secuencias e introducir huecos si es necesario, para lograr la identidad de secuencia máxima y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. La identidad de secuencia se calcula preferentemente sobre la longitud completa de las secuencias respectivas.

60 La alineación con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de diversas maneras conocidas por un experto en la materia, por ejemplo, usando software informático disponible públicamente tal como software ClustalW 1.82, T-coffee o Megalign (DNASTAR). Cuando se usa dicho software, se usan preferentemente los parámetros por defecto, por ejemplo, para penalización por hueco y penalización por extensión. Los parámetros por defecto de ClustalW 1.82 son: penalización por apertura de hueco de proteína = 10,0, penalización por extensión de hueco de proteína = 0,2, matriz de proteínas = Gonnet, proteína/ADN ENDGAP = -1,  
65 proteína/ADN GAPDIST = 4.

En determinados aspectos, la divulgación se refiere a compuestos que son péptidos/polipéptidos aislados que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 60 % con una secuencia dada. Como alternativa, esta identidad puede ser cualquiera de 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % de identidad de secuencia.

5 La identidad de secuencias de ácido nucleico puede determinarse de una manera similar que implica alinear las secuencias e introducir huecos si es necesario, para lograr la identidad de secuencia máxima y calcular la identidad de secuencia sobre la longitud completa de las secuencias respectivas.

10 En determinados aspectos, la divulgación se refiere a compuestos que son ácidos nucleicos aislados que comprenden una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 60 % con una secuencia dada. Como alternativa, esta identidad puede ser cualquiera de 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % de identidad de secuencia.

15 Determinados aspectos de la divulgación se refieren a proteasas aspárticas vegetales completas (es decir, que comprenden sustancialmente todos los dominios presentes en la proteína de tipo silvestre). Por ejemplo, la cardosina A puede tener una secuencia de aminoácidos que tenga un grado especificado de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 o la cardosina B puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene un grado especificado de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4.

20 Preferentemente, las proteasas aspárticas vegetales de la divulgación carecen de un dominio de PSI funcional. Por ejemplo, la cardosina B puede tener una secuencia de aminoácidos que tenga un grado especificado de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 o la cardosina A puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene un grado especificado de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2.

25 Un fragmento puede comprender una secuencia de nucleótidos o aminoácidos que codifica una parte de la secuencia de longitud completa correspondiente. En esta memoria descriptiva, la secuencia de longitud completa correspondiente puede ser una de las SEQ ID NO: 1, 2, 5 o 6. Dicha parte puede ser de longitud definida y puede tener una longitud mínima y/o máxima definida.

30 En consecuencia, el fragmento puede comprender al menos, es decir, tener una longitud mínima de, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99 % de la secuencia de longitud completa correspondiente. El fragmento puede tener una longitud máxima, es decir, no ser mayor de, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99 % de la secuencia de longitud completa correspondiente. El fragmento puede tener cualquier longitud entre dicha longitud mínima y máxima.

35 El fragmento puede comprender al menos, es decir, tener una longitud mínima de, al menos 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 377, 380, 383, 400, 420, 440, 460, 480 o 500 aminoácidos. El fragmento puede tener una longitud máxima, es decir, no ser mayor de, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 377, 380, 383, 400, 420, 440, 460, 480 o 483 aminoácidos.

40 En algunas realizaciones, la proteasa aspártica vegetal puede ser una proteasa aspártica vegetal mutante o modificada, tal como una cardosina mutante o modificada. La proteasa aspártica vegetal puede mutarse en relación con la proteasa aspártica vegetal de tipo silvestre o genómica, que porta una o más alteraciones del ácido nucleico que codifica la proteasa aspártica vegetal y/o de la secuencia de aminoácidos de la proteasa aspártica vegetal. La alteración puede tomar la forma de una adición, inserción, sustitución o supresión.

45 En algunas realizaciones de la divulgación, la proteasa aspártica vegetal se muta de manera que no tenga un dominio de PSI funcional. En algunos casos, el dominio de PSI está total o sustancialmente ausente. En otros, se incluye al menos una mutación en la secuencia de proteína y/o ácido nucleico de manera que el dominio de PSI de la proteasa aspártica no se transcribe completamente, se transcribe incorrectamente o de otro modo no es funcional. Las mutaciones pueden ser mutaciones puntuales o mutaciones mayores, en donde se añaden, sustituyen, suprimen o insertan uno o más pares de bases de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteasa aspártica. En algunos casos, la mutación es una que provoca que los ácidos nucleicos posteriores se transcriban fuera del marco, produciendo de este modo un producto proteico no funcional. En otros casos, la mutación de un solo par de bases provoca una alteración en la secuencia de proteína de manera que el producto proteico no es funcional. Cuando la mutación hace que los ácidos nucleicos posteriores se transcriban fuera del marco, puede ser necesario incluir un cambio adicional cadena abajo de la primera mutación para restaurar la transcripción de una parte posterior de la proteína, por ejemplo, después de parte o la totalidad del dominio de PSI, de vuelta al marco.

50 Se conocen en la técnica métodos para introducir mutaciones y la persona experta apreciará fácilmente métodos adecuados para crear una proteasa aspártica vegetal modificada o mutante según la divulgación. Preferentemente, se introducen mutaciones por mutagénesis dirigida, por ejemplo, a través de mutagénesis por PCR. La mutagénesis por PCR es un método para generar mutaciones puntuales en un plásmido bicatenario e implica el uso de dos cebadores oligonucleotídicos sintéticos que contienen la mutación deseada, cada uno complementario de las cadenas opuestas de un vector que contiene la proteasa aspártica vegetal para mutar.

*Métodos para producir una proteasa aspártica vegetal*

5 Se pueden producir proteasas aspárticas vegetales según cualquier método conocido en la técnica, tal como fermentación microbiana, cultivo de células vegetales, de insectos o de mamíferos.

10 Determinados métodos según la divulgación implican expresar una proteasa aspártica vegetal que carece de un dominio de PSI funcional en una célula. El método comprende opcionalmente además la etapa de recoger proteasa aspártica vegetal que ha sido secretada por la célula.

15 Se conocen bien en este campo técnicas de biología molecular adecuadas para la producción de proteasas aspárticas vegetales según la divulgación en células, tales como las expuestas en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1989.

20 La proteasa aspártica vegetal puede expresarse a partir de una secuencia de nucleótidos que codifica la proteasa aspártica vegetal. La secuencia de nucleótidos puede estar contenida en un vector presente en la célula o puede incorporarse al genoma de la célula.

25 Un "vector" como se usa en el presente documento es una molécula oligonucleotídica (ADN o ARN) usada como vehículo para transferir material genético extraño a una célula. El vector puede ser un vector de expresión para la expresión del material genético extraño en la célula. Dichos vectores pueden incluir una secuencia promotora unida operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia génica para expresar. Un vector también puede incluir un codón de terminación y potenciadores de la expresión. Cualquier vector, promotor, potenciador y codón de terminación adecuado conocido en la técnica puede usarse para expresar proteasas aspárticas vegetales a partir de un vector según la divulgación. Los vectores adecuados incluyen plásmidos, vectores binarios, vectores víricos y cromosomas artificiales (por ejemplo, cromosomas artificiales de levadura).

30 En la presente memoria descriptiva, la expresión "unido operativamente" puede incluir la situación en la que una secuencia de nucleótidos seleccionada y una secuencia de nucleótidos reguladora (por ejemplo, promotor y/o potenciador) están unidas covalentemente de manera que coloque la expresión de la secuencia de nucleótidos bajo la influencia o control de la secuencia reguladora (formando de este modo un casete de expresión). Por tanto, una secuencia reguladora está unida operativamente a la secuencia de nucleótidos seleccionada si la secuencia reguladora es capaz de efectuar la transcripción de la secuencia de nucleótidos. Cuando sea adecuado, el transcrito resultante se puede traducir después en una proteína o un polipéptido deseado.

35 Cualquier célula adecuada para la expresión de polipéptidos puede usarse para producir proteasas aspárticas vegetales según la divulgación. La célula puede ser una procariota o eucariota. Preferentemente, la célula es una célula eucariota tal como una célula de levadura, una célula vegetal, una célula de insecto o una célula de mamífero. En algunos casos, la célula no es una célula procariota porque algunas células procariotas no permiten las mismas modificaciones postraduccionales que las eucariotas. Además, son posibles niveles de expresión muy altos en eucariotas y las proteínas pueden ser más fáciles de purificar a partir de eucariotas usando marcadores apropiados. También se pueden utilizar plásmidos específicos que potencien la secreción de la proteína en los medios.

40 En algunas realizaciones, la célula no es una célula vegetal o una célula protoplástica vegetal.

45 En algunas realizaciones preferidas, la célula es un eucariota fúngico (incluyendo levaduras y mohos) o microbiano, o eucariota unicelular, preferentemente una levadura del género *Kluyveromyces*, *Rhizomucor*, *Endothia*, *Apergillus* o *Saccharomyces*.

50 Las células de levadura adecuadas incluyen *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Rhizomucor meihei*, *Endothia parasitica*, *Rizomucor pusillus*, *Pichia pastoris*, *Aspergillus niger*, *Apsergillus oryzae* y *Saccharomyces cerevisiae*. La levadura puede ser una levadura GRAS (generalmente considerada segura), es decir, una levadura que tiene el estado GRAS de la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA).

55 Los métodos para producir la proteasa aspártica vegetal pueden implicar cultivo o fermentación de una célula eucariota modificada para expresar la proteasa aspártica vegetal. El cultivo o la fermentación se pueden realizar en un biorreactor provisto de un suministro adecuado de nutrientes, aire/oxígeno y/o factores de crecimiento. Las proteínas secretadas se pueden recoger dividiendo los medios de cultivo/caldo de fermentación de las células, extrayendo el contenido de proteínas y separando proteínas individuales para aislar proteasa aspártica secretada.  
60 Los expertos en la materia conocen bien técnicas de cultivo, fermentación y separación.

65 Los biorreactores incluyen uno o más vasos en los que se pueden cultivar células. El cultivo en el biorreactor puede realizarse de manera continua, con un flujo continuo de reactivos en, y un flujo continuo de células cultivadas de, el reactor. Como alternativa, el cultivo puede realizarse en lotes. El biorreactor supervisa y controla las condiciones ambientales tales como pH, oxígeno, caudales de entrada y salida y agitación dentro del vaso de manera que se proporcionen condiciones óptimas para las células que se cultivan.

Después del cultivo de células que expresan una proteasa aspártica vegetal, la proteasa aspártica vegetal preferentemente se aísla. Puede usarse cualquier método adecuado para separar proteínas del cultivo celular conocido en la técnica. Para aislar una proteína de interés de un cultivo, puede ser necesario separar primero las células cultivadas de los medios que contienen la proteína de interés. Si la proteína de interés es secretada por las células, las células pueden separarse de los medios de cultivo que contienen la proteína secretada por centrifugación. Si la proteína de interés se acumula dentro de la célula, por ejemplo, en la vacuola de la célula, será necesario romper las células antes de la centrifugación, por ejemplo, usando sonicación, congelación-descongelación rápida o lisis osmótica. La centrifugación producirá un sedimento que contiene las células cultivadas, o residuos celulares de las células cultivadas, y un sobrenadante que contiene medio de cultivo y la proteína de interés.

Entonces puede ser deseable aislar la proteína de interés del sobrenadante o medio de cultivo, que puede contener otros componentes proteicos y no proteicos. Un enfoque común para separar los componentes proteicos de un sobrenadante o medio de cultivo es por precipitación. Las proteínas de diferentes solubilidades se precipitan a diferentes concentraciones de agente precipitante tal como sulfato de amonio. Por ejemplo, a bajas concentraciones de agente precipitante, se extraen proteínas hidrosolubles. Por tanto, añadiendo diferentes concentraciones crecientes de agente precipitante, se pueden distinguir proteínas de diferentes solubilidades. Posteriormente se puede usar diálisis para eliminar el sulfato de amonio de las proteínas separadas.

Otros métodos para distinguir diferentes proteínas son conocidos en la técnica, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de tamaño. Estos pueden usarse como una alternativa a la precipitación o pueden realizarse posteriormente a la precipitación.

Una vez que la proteína de interés ha sido aislada del cultivo, puede ser necesario concentrar la proteína. En la técnica se conocen varios métodos para concentrar una proteína de interés, tales como ultrafiltración o liofilización.

Una proteasa aspártica vegetal que se ha aislado de una célula puede mezclarse con un vehículo, adyuvante o diluyente para formar un producto que comprende una composición que contiene la proteasa aspártica vegetal. El producto formado puede ser de cualquier tipo, por ejemplo, líquido, sólido, polvo, crema y puede ser adecuado para al menos cualquiera de los siguientes usos: como detergente o detergente en polvo, como modificador de alimentos, como ablandador de carne, como coagulante de leche, como quitamanchas, como suavizante de cuero, como sustituto del cuajo.

### 35 *Métodos para promover la acumulación de un polipéptido de interés*

La divulgación también proporciona métodos para promover la acumulación de un polipéptido de interés en la vacuola de una célula, en particular una célula vegetal. Dichos métodos implican expresar una construcción polipeptídica en la célula, comprendiendo la construcción la secuencia de aminoácidos del polipéptido de interés y la secuencia de aminoácidos de un dominio de PSI. Las secuencias de aminoácidos están preferentemente unidas covalentemente para formar una única secuencia de aminoácidos contigua que forma la construcción polipeptídica. Como tal, en algunas realizaciones, la construcción polipeptídica puede ser una proteína de fusión.

El dominio de PSI puede incluirse en la secuencia de aminoácidos de la construcción en cualquier posición. En algunas realizaciones, el dominio de PSI puede añadirse en una cualquiera del extremo N, extremo C o una posición entre los extremos N y C.

El polipéptido de interés puede ser cualquier polipéptido, pero preferentemente no es un polipéptido que normalmente (es decir, en la secuencia de tipo silvestre) codifica un dominio de PSI. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el polipéptido de interés no es una proteasa aspártica y en algunas realizaciones el polipéptido de interés no es una proteasa aspártica vegetal.

El polipéptido de interés es preferentemente un polipéptido que forma una proteína que tiene una actividad medible, por ejemplo, unión a otra molécula o actividad enzimática. La construcción polipeptídica preferentemente conserva dicha actividad medible, aunque el nivel de actividad puede reducirse o aumentarse en comparación con el polipéptido de tipo silvestre de interés. Como tal, el polipéptido tendrá normalmente una longitud mínima de al menos aproximadamente 50 aminoácidos y más preferentemente una de aproximadamente 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290 o 300 aminoácidos.

En algunas otras realizaciones, el polipéptido de interés puede ser un péptido pequeño y puede tener una longitud de menos de aproximadamente 50 aminoácidos.

La construcción polipeptídica puede expresarse a partir de una secuencia de nucleótidos que codifica la construcción polipeptídica. La secuencia de nucleótidos puede estar contenida en un vector presente en la célula o puede incorporarse al genoma de la célula.

Se conocen bien en este campo técnicas de biología molecular adecuadas para la producción de proteasas aspárticas vegetales según la divulgación en células, tales como las expuestas en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1989.

- 5 Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en la descripción adjunta a continuación, incluyendo detalles específicos del mejor modo contemplado por los inventores para llevar a cabo la invención, a modo de ejemplo. Será evidente para un experto en la materia que la presente invención se puede practicar sin limitación a estos detalles específicos.

## 10 Ejemplos

### Ejemplo 1 - Síntesis de cardosina B en *K. lactis*

#### Cepas y condiciones de crecimiento

- 15 Todas las construcciones y propagaciones de plásmidos se realizaron usando la cepa de *Escherichia coli* Top10F' (Invitrogen). Las células bacterianas se cultivaron a 37 °C en medio LB líquido (Formulación de Miller - Invitrogen) y sólido (agar al 1,5 %), complementado con ampicilina a 100 µg/ml (GE-Healthcare). La cepa de *Kluyveromyces lactis* GG799 se adquirió de New England Biolabs y se usó como cepa hospedadora para los estudios de expresión de proteínas recombinantes. Se cultivaron células de *K. lactis* y se mantuvieron en medios YPD (2 % de bactopectona, 1 % de extracto de levadura, 2 % de glucosa) mientras que los experimentos de expresión se realizaron en YPGal (2 % de bactopectona, 1 % de extracto de levadura, 4 % de galactosa) como medio de cultivo, ambos a 30 °C con agitación. Las células recombinantes de *K. lactis* se seleccionaron en base de carbono de levadura sólida (New England Biolabs) complementada con placas de acetamida 5 mM (New England Biolabs).

#### 25 Subclonación de proCardosinaB $\Delta$ PSI pKLAC1

- Los procedimientos de clonación y subclonación se realizaron según las instrucciones de los fabricantes y usando técnicas convencionales de clonación de biología molecular. La construcción proCardosinaB que carece de la región de PSI (pCB $\Delta$ PSI, también denominado en el presente documento Bwo) se amplificó mediante PCR, usando la construcción pCB $\Delta$ PSI/TA como molde, para introducir cadena arriba y cadena abajo del ADNc los sitios de restricción XhoI y Sall, respectivamente. El par de oligonucleótidos usados en la reacción de PCR fueron: pCB-XhoI (C7CGAGAAAAGAATGGTCTCCAACGGCGGATTGCTTC [SEQ ID NO: 7]) y pCB-Sall (G7CGACTCAAACCTGCTTCTGCAAATCCCACTCGTAAC [SEQ ID NO: 8]). Después de la amplificación, el producto de PCR se clonó en el vector de clonación pGEM (Promega) y a continuación se subclonó en el pKLAC1 de expresión integrativa (NEB). El proceso de subclonación se realizó mediante escisión/ligamiento en los sitios de restricción XhoI/Sall, dando como resultado la clonación de pCB $\Delta$ PSI en marco con la secuencia líder de secreción del factor de acoplamiento  $\alpha$ .

#### 40 Construcción de cepas recombinantes de *K. lactis*

- El plásmido recombinante pCB $\Delta$ PSI/pKLAC1 se linealizó mediante digestión por SacII (NEB), para obtener los fragmentos de casetes de inserción que a continuación se usaron en la etapa de transformación de *K. lactis*. Se usó un total de 2 µg de ADN en transformación de *K. lactis* GG799. Este proceso se realizó mediante electroporación con un aparato "Gene Pulser" (BioRad), usando las siguientes condiciones de electroporación: 1,5 KV, 25 mF y 200 Ohm. Los transformantes positivos se seleccionaron en función de su capacidad de crecimiento en medios de acetamida YCB y los clones multi-integrantes seleccionados por PCR de células completas, siguiendo las instrucciones descritas en los protocolos de "kit de expresión de *K. lactis*" (NEB).

#### 50 Expresión y purificación de mutantes de pCB $\Delta$ PSI heterólogos

- Se seleccionó un clon recombinante integrativo de *K. lactis* para la construcción pCB $\Delta$ PSI y se cultivó en medios YPD, a 30 °C con agitación, durante 16 h. Los cultivos se diluyeron a una DO600 nm de 0,3 en medios YPGal y se incubaron a 30 °C, con agitación durante 4 días. A continuación, los cultivos se centrifugaron y los sobrenadantes se filtraron secuencialmente a través de filtros de 0,8 µm, 0,45 µm y 0,2 µm. Las muestras se concentraron y activaron mediante dilución 1:10 con tampón de acetato de sodio 0,5 M a pH 4,0, a 37 °C. Una cromatografía de exclusión por tamaño fue la primera etapa de purificación. Las muestras se aplicaron a una columna S200 26/60 (GE-Healthcare) y las proteínas se eluyeron con tampón Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 0,1 M a un caudal de 1 ml/min.

- 60 Las fracciones con actividad de cuajado de leche se agruparon y se aplicaron a un intercambio iónico en un Mono Q, usando el tampón Tris-HCl 20 mM pH 7,5. Las proteínas se eluyeron después con un gradiente lineal de NaCl 0-0,5 M, a un caudal de 0,75 ml/min. Los procedimientos tanto de expresión como de purificación fueron seguidos de análisis de SDS-PAGE (véase Figura 1).

#### 65 Ensayos de actividad de cuajado de la leche

La actividad de cuajado de la leche se probó usando una solución de leche desnatada al 12 % en CaCl<sub>2</sub> 10 mM. Los sobrenadantes y las fracciones purificadas se mezclaron con la solución de leche y se incubaron a 37 °C. El tiempo de cuajado se determinó mediante observación visual.

- 5 Este método de expresión y purificación da como resultado la producción de una enzima de origen vegetal en cantidades considerables (3 mg/l) y con un alto nivel de pureza.

**Ejemplo 2 - Actividad de cuajado de la leche de cardosina recombinante**

10 *Preparación de VRen*

La cepa recombinante descrita en el Ejemplo 1 se cultivó en medio YPD y la expresión de la enzima se indujo cambiando el medio a YPGal. Después de la producción de enzimas, el medio de cultivo se aisló del material celular mediante centrifugación y filtración y se acidificó a pH 5,0 para activar la enzima (este sobrenadante procesado es la preparación del cuajo y se denomina por la presente VRen). El VRen usado en los estudios de cuajado de la leche usando leche cruda y pasteurizada, fue sometido adicionalmente a una etapa de concentración.

*Estudio de la actividad de cuajado de la leche de VRen usando leche desnatada*

- 20 La actividad de cuajado de la leche de VRen se probó inicialmente usando una solución de leche desnatada, en tubos de ensayo, a 37 °C. Una muestra de 100 µl de medio de cultivo resultante de la expresión de construcción pCB en un sistema de expresión de levadura, se añadió a 1 ml de solución de leche desnatada al 12 % preparada en CaCl<sub>2</sub> 10 mM. La mezcla se incubó a 37 °C y el tiempo de cuajado de la leche se determinó mediante observación visual. La coagulación de la leche se produjo después de un tiempo de incubación de aproximadamente 30 minutos.

*Estudio de la actividad de cuajado de la leche de VRen utilizando leche cruda y pasteurizada*

- 30 La fabricación de queso usando VRen como agente de cuajado de la leche se probó usando tres tipos de leche: oveja, cabra y vaca y el procedimiento de fabricación de queso fue similar para todos los tipos de quesos. Cada queso se produjo usando 3 l de leche y, dependiendo del tipo de leche, se usaron diferentes cantidades de VRen (tabla I) para obtener un tiempo de coagulación de aproximadamente 40 minutos. El proceso se inició mediante la adición de VRen y sal (15 g/l) a la muestra de leche y posteriormente incubación de la mezcla en un baño de agua a 32 °C, permitiendo la formación de cuajada y el inicio de la sinéresis. Una vez formada, la cuajada se cortó en 35 ambos sentidos - horizontal y verticalmente - con una espátula, acelerando el proceso de sinéresis. Se permitió que se produjera la liberación del suero de la cuajada durante otros 5 minutos, antes del proceso de drenaje de suero y prensado de cuajada. Después de un prensado manual en moldes de plástico, la cuajada se comprimió usando una prensa que dio como resultado la liberación completa del suero. Finalmente, el queso se incubó en una cámara de maduración durante tres semanas (Figura 3).

40

Tabla I

Cantidad de VRen usada en el proceso de coagulación de diferentes tipos de leche		
Leche	Enzima (mg)/Leche (l)	Enzima (mg)/Queso (kg)
Cabra (cruda)	3,1	31,4
Oveja (cruda)	1,5	10,2
Oveja (pasteurizada)	1,4	8,4
Oveja (Bordaleira)	2,0	10,3
Vaca (pasteurizada)	6,6	56,4

**Ejemplo 3 - Propiedades cinéticas de cardosina modificada**

- 45 Usando el péptido fluorogénico (MCA) Lys-Lys-Pro-Ala-Glu-Phe-Phe-Ala-Leu-Lys (DNP), las propiedades cinéticas de la cardosina truncada producida en el Ejemplo 2 se compararon con la cardosina nativa B. Las diferencias observadas sugieren que esta construcción truncada es menos eficaz para escindir este sustrato, en comparación con la cardosina nativa B.

50

Tabla II

Parámetros cinéticos de cardosina B modificada frente a tipo silvestre				
	Km (uM)	V <sub>máx</sub> (umol/s)	kcat (s-1)	kcat/Km (uM-1s-1)
nCB	1,4	6,36x10-6	24	17,1
pCBΔ PSI	8,7	2,15x10-5	36,5	4,2

Por tanto, la introducción de un conector de 3 Gly en lugar del dominio de PSI cambia los parámetros cinéticos de la cardosina B y, por tanto, la eficacia catalítica de la enzima.

Se observaron diferencias de especificidad entre la cardosina B de cadena sencilla recombinante producida en este trabajo y la cardosina B nativa cuando los perfiles de especificidad hacia la  $\alpha$ -caseína se compararon mediante RP-HPLC. Véase la figura 4.

5 La cardosina B recombinante (**pCB $\Delta$ PSI**) presentó una especificidad más restringida hacia esta proteína de la leche que da como resultado la formación de un número reducido de fragmentos proteolíticos en comparación con la cardosina B nativa (nCB, línea negra).

10 Por tanto, la presencia del conector alteró, pero no impidió, la actividad enzimática.

#### Ejemplo 4 - Construcciones de cardosina A modificada

15 Se ha desarrollado una estrategia para potenciar los niveles de secreción de cardosina A recombinante para mejorar el rendimiento de producción. Esta estrategia ha comprendido la manipulación de dos regiones de la enzima: el dominio de PSI y la región C-terminal. Se construyeron diferentes mutantes de cardosina A, mediante ingeniería de proteínas, como se muestra en la figura 5 y como se expone en la tabla III.

Tabla III

Descripción de las construcciones de cardosina A		
Grupo	Construcción	Descripción
Manipulación del dominio de PSI	pCA $\Delta$ PSI	Supresión de la región de PSI
Manipulación del dominio de PSI	pCA(PSIB)	Intercambio del dominio de PSI de cardosina B por cardosina A
Manipulación del dominio C-terminal	pCA $\Delta$ AEAA	Supresión de la secuencia C-terminal (AEAA)
Manipulación del dominio C-terminal	pCA(PSIB) $\Delta$ AEAA	Supresión de la secuencia C-terminal (AEAA) de la construcción pCA(PSIB)
Manipulación del dominio C-terminal	pCA_FAEAV	Mutación del aminoácido C-terminal a una valina, para imitar la secuencia C-terminal de cardosina B

#### 20 **Producción de mutantes recombinantes de cardosina A**

Las construcciones se obtuvieron mediante metodologías convencionales de ADN recombinante y el ADNc de cada construcción se introdujo en el ADN genómico de *K. lactis*. La integración se realizó mediante recombinación homóloga, se confirmó mediante PCR de colonias y después se seleccionaron aleatoriamente varios clones de cada construcción para la producción de proteínas. Después de la producción de enzimas en medio YPGal, los cultivos se aislaron del material celular mediante centrifugación y después se acidificaron a pH 4,5, para activar la enzima recombinante. Estas muestras activadas se usaron en experimentos de hidrólisis de  $\kappa$ -caseína. Para estudios de cuajado de la leche, las muestras activadas se sometieron adicionalmente a una etapa de concentración.

#### 30 **Actividad de cuajado de la leche de construcciones de cardosina A**

Se probó la actividad de cuajado de la leche de cada construcción usando una solución de leche desnatada, en tubos de ensayo, a 37 °C. Se añadió una alícuota (100  $\mu$ l) de muestra activada y concentrada a 1 ml de solución de leche desnatada al 12 % preparada en CaCl<sub>2</sub> 10 mM. La mezcla se incubó a 37 °C y el tiempo de cuajado de la leche se determinó mediante observación visual.

Tabla IV

Actividad de cuajado de la leche de diferentes construcciones de cardosina A		
Construcción	Concentración	Tiempo de cuajado de la leche
pCA $\Delta$ PSI	40x	60 min
p $\Delta$ AEAA	20x	50 min
pCA_FAEAV	10x	90 min
pCA(PSIB)	20x	30 min

40 Algunos clones de las diferentes construcciones pudieron cuajar la leche desnatada, en un tiempo aceptable de cuajado de la leche (Tabla IV).

**Hidrólisis de κ-caseína por construcciones de cardosina A**

5 La proteólisis de κ-caseína por enzimas recombinantes fue estudiada por SDS-PAGE. La κ-caseína comercial se disolvió en agua y después se diluyó en tampón de fosfato de sodio 0,1 M pH 6,8, hasta una concentración final de 0,3 mg/ml. Se incubaron muestras de extracto (0,25 µl por µl de volumen de reacción) con κ-caseína y se permitió que la reacción de digestión continuara a 37 °C, durante 2 horas. Las reacciones se detuvieron calentando las muestras a 90 °C, durante 10 minutos, en presencia de solución desnaturizante. Las digestiones se analizaron mediante SDS-PAGE.

10 La actividad caseinolítica de construcciones de cardosina A se demostró mediante la detección de una banda de 15 kDa después del periodo de incubación. Como se muestra en la figura 6, la actividad enzimática hacia κ-caseína fue más lenta para el clon pCA\_FAEAV.

**Conclusiones:**

15 Este estudio reveló que la manipulación de regiones de PSI y/o C-terminales de cardosina A ha mejorado la producción de enzimas a niveles detectables. La manipulación de estas regiones dio como resultado la producción de mutantes de cardosina A con actividad de cuajado de la leche y actividad enzimática hacia κ-caseína.

20 Nuestros datos respaldan la predicción de que PSI actúa como una señal de clasificación vacuolar porque fue posible detectar la actividad de cuajado de la leche/digestión de K-caseína con las construcciones donde el dominio de PSI de cardosina A estaba ausente o intercambiado con la secuencia del dominio de PSI de cardosina B, que es coherente con el aumento de la secreción de cardosina A. Debido a que la cardosina B es una enzima extracelular, los inventores plantearon la hipótesis de que el dominio de PSI de cardosina B podría reconocerse/procesarse diferencialmente durante el transporte de proteínas y los resultados de los inventores con pCA(PSIB) y pCA(PSIB)ΔAEAA corroboran adicionalmente esta suposición inicial.

Tabla V: Sumario de los datos recopilados.

Construcción	Clones positivos/clones totales	Cuajado de la leche (concentración de muestra, tiempo)	Actividad enzimática (κ - caseína)
pCAΔ PSI	1/20	[40x], 60'	✓
pCAΔAEAA	1/21	[20x], 50'	✓
pCA_FAEAV	5/10	[10x], 90'	✓
pCA(PSIB)	19/20	[20x], 30'	✓
pCA(PSIB) Δ AEAA	8/10	-	✓

30 **Ejemplo 5 - Construcciones modificadas de cardosina B**

Se probaron las siguientes construcciones de cardosina B:

Grupo I: supresión de todo el dominio de PSI + conectores de diferentes tamaños y secuencias

35 Grupo II: supresión de todo el dominio de PSI sin conector

Grupo III: supresión parcial del dominio de PSI +/- diferentes conectores

40 **Lista de construcciones**

El clon pCBΔPSI (VRen) contiene un conector de 3 restos de glicina entre la cadena pesada y la cadena ligera de la enzima. Basándose en esto, se diseñaron diferentes mutantes para cada grupo de construcciones como se muestra en la Tabla VI a continuación. En la figura 7 se muestra una alineación de secuencias parciales de la construcción correspondiente a la región de PSI/conector de cada construcción.

Tabla VI: Descripción de las construcciones de cardosina B

Grupo de construcciones	Clon	Descripción
I	pCBΔPSI_4G	Conector con diferente tamaño (4 restos de glicina)
I	pCBΔPSI_6G	Conector con diferente tamaño (6 restos de glicina)
I	pCBΔPSI_NQG	Conector con el mismo tamaño pero diferente secuencia (NQG)
II	pCBΔPSIΔLK	Supresión de todo el dominio de PSI (sin conector)

(continuación)

Grupo de construcciones	Clon	Descripción
III	pCBΔPSI_2C	Eliminación parcial de PSI: construcción idéntica a la forma activada de cardosina recombinante A, producida en el sistema de expresión de <i>E. coli</i>
III	pCBΔPSIΔbucle	Eliminación parcial de PSI: el dominio de PSI está compuesto por 5 hélices α y una región de bucle localizada entre la tercera y la cuarta hélices α. Esta construcción contiene un PSI sin la región de bucle.

#### **Clonación molecular de construcciones de cardosina B y producción de enzimas recombinantes**

5 Todos los mutantes, excepto pCBΔPSI\_2C y pCBΔPSIΔbucle, se obtuvieron mediante mutagénesis dirigida usando el clon pCBΔPSI como molde y un par de cebadores adecuados para cada construcción. Las construcciones pCBΔPSI\_2C y pCBΔPSIΔbucle se obtuvieron usando la técnica de PCR cruzada, con un par apropiado de cebadores y ADNc de cardosina B como molde. El ADNc de cada construcción se introdujo en el ADN genómico de levadura de expresión, mediante recombinación homóloga. La integración se confirmó mediante PCR de colonias y se seleccionaron aleatoriamente diez clones de cada construcción para la producción de proteínas en medio YPGal. Después de la producción de enzimas, el medio de cultivo se aisló del material celular mediante centrifugación y después se acidificó a pH 4,5, para activar la enzima. Estas muestras activadas se usaron en los siguientes experimentos.

#### **Análisis de los niveles de expresión mediante transferencia de Western**

15 La expresión de mutantes de cardosina B se observó mediante transferencia de Western. Las muestras se incubaron con solución desnaturante y se cargaron en geles de poliacrilamida al 12,5 % para SDS-PAGE. Después de la separación electroforética, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF y se inmunodetectaron usando un anticuerpo específico para cardosina B (véase figura 8). Los resultados han mostrado que todas las construcciones se expresaron y secretaron, sin embargo, se observaron algunas diferencias en los niveles de secreción. Ambas construcciones pCBΔPSI\_2C y pCBΔPSIΔbucle (grupo III) presentaron niveles menores de secreción en comparación con las construcciones restantes, lo que sugiere una influencia de la región de PSI en los niveles de secreción de la enzima. Por otra parte, el procesamiento de estas construcciones también es diferente, con la detección de una banda con menor peso molecular.

#### **Hidrólisis de κ-caseína por construcciones de cardosina B**

25 La proteólisis de κ-caseína por enzimas recombinantes fue estudiada por SDS-PAGE. La κ-caseína comercial se disolvió en agua y después se diluyó en tampón de fosfato de sodio 0,1 M pH 6,8, hasta una concentración final de 0,3 mg/ml. Se incubaron muestras de extracto (0,05 μl por μl de volumen de reacción) con κ-caseína y se permitió que la reacción de digestión continuara a 37 °C, durante 15 minutos. Las reacciones se detuvieron calentando las muestras a 90 °C, durante 10 minutos, en presencia de solución desnaturante. Las digestiones se analizaron mediante SDS-PAGE.

35 Después del periodo de incubación, se observó una banda de aproximadamente 15 kDa (para-κ-caseína) para todas las reacciones. La proteólisis fue más lenta para pCBΔPSI\_2C y pCBΔPSIΔbucle probablemente debido a los niveles reducidos de secreción de estas construcciones (como se muestra en la figura 9).

#### **Actividad de cuajado de la leche de construcciones de cardosina B**

40 Se probó la actividad de cuajado de la leche de cada construcción usando una solución de leche desnatada, en tubos de ensayo, a 37 °C. Una muestra de 100 μl de medio de cultivo resultante de la expresión de construcción pCB en un sistema de expresión de levadura, se añadió a 1 ml de solución de leche desnatada al 12 %, preparada en CaCl<sub>2</sub> 10 mM. La mezcla se incubó a 37 °C y el tiempo de coagulación de la leche se determinó mediante observación visual y los resultados se muestran en la figura 10.

Una vez más, todas las construcciones, excepto pCBΔPSI\_2C y pCBΔPSIΔbucle pudieron cuajar la leche desnatada (para estas dos construcciones, se observó actividad de cuajado de la leche solo después de un periodo de incubación de 16 h), lo que probablemente refleja su baja eficacia de producción.

Tabla VII

Actividad de cuajado de la leche de diferentes construcciones de cardosina B			
Construcción	Clones positivos/clones totales	Tiempo de cuajado de la leche (menor tiempo)	Cuajado de la leche (concentración de muestra, tiempo)
pCBA PSI	10/10	40'	√
pCBA PSI_4G	10/10	50'	√
pCBA PSI_6G	10/10	75'	√
pCBA PSI_NQG	9/10	40'	√
pCBA PSIΔconector	10/10	40'	√
pCBA PSI_2C	9/10	16 h	√
pCBA PSIΔbucle	9/10	16 h	√

### Conclusiones

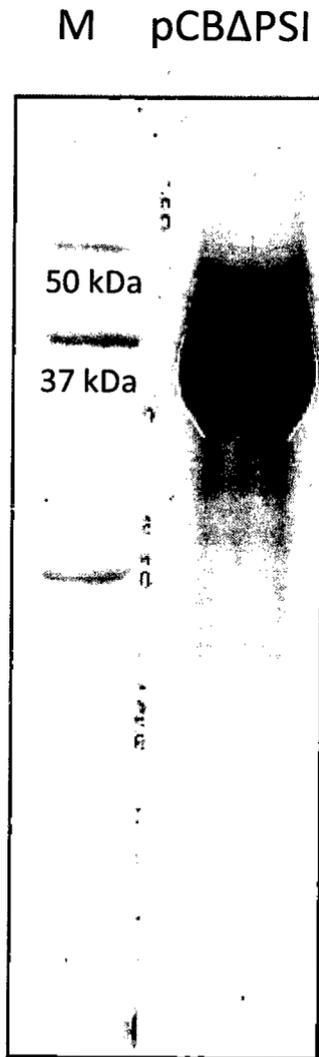
- 5 Se muestra un resumen de los resultados de este estudio en la figura 11, en el que se seleccionó un clon de cada construcción y se repitieron los experimentos tanto de k-caseína como de transferencia de Western. Este estudio reveló que diferentes construcciones de cardosina B presentan rendimientos significativos de expresión y secreción y buena actividad de cuajado de la leche y caseinólítica, condiciones que son necesarias para la fabricación de queso. Por otra parte, fue posible verificar que la eliminación parcial del dominio de PSI influye en la producción de proteínas sin alterar la actividad caseinólítica.
- 10

### REFERENCIAS

- 1 Vitale A y Hinz G, 2005. Trends in Plant Sci, 10 (7): 316 - 323
- 15 2 Törmakangas K *et al*, 2001. Plant Cell, 13: 2021-2032
- 3 Simões I y Faro C, 2004. Eur. J. Biochem. 271, 2067-2075
- 4 Törmakangas K *et al*, 2001. Plant Cell, 13: 2021-2032
- 5 Ramalho-Santos M *et al*, 1998. Eur J Biochem, 255: 133-138
- 6 Duarte AS, *et al*, 2005. Current Drug Disc Tech, 2: 37-44
- 20 7 Publicación de patente PCT n.º WO9507687
- 8 Publicación de patente n.º JP2000247907
- 9 Publicación de patente de los Estados Unidos n.º US2003040047
- 10 Veríssimo P *et al* (1996) Eur J Biochem. 235 (3): 762-8.
- 11 Veríssimo P *et al* (1996) Eur J Biochem, 762-768
- 25 12 Chu TC, 1997. Medicine, 25:30-33
- 13 Smithard A *et al*, 2001. Br J Dermatol, 145: 274-279
- 14 Pearl A *et al*, 1998. NZ Med J, 111:269-271
- 15 Cunliffe WJ, 1998. J Cutan Med Surg, 2 (supl. 3): 7-13
- 16 Fowler JF *et al*, 2008. J Am Acad Dermatol, 59(5): 772-80
- 30 17 Horn EJ *et al*, 2007. J Am Acad Dermatol, 57(6): 963-71
- 18 Egas C *et al*, 2000. J. Biol. Chem, 275, 38190-38196
- 19 Claverie-Martin *et al*, 2007. Industrial Enzymes 207-219

**REIVINDICACIONES**

1. Una cardosina B recombinante, en donde, en comparación con la cardosina B de tipo silvestre, el dominio de inserto específico vegetal (PSI) se elimina por completo o en donde el dominio de PSI se reemplaza completamente con un péptido conector de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos.
2. La cardosina B recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la cardosina recombinante se expresa con un segmento pro.
3. La cardosina B recombinante según la reivindicación 1, que tiene al menos un 95 % o al menos un 98 % de identidad con la SEQ ID NO: 1.
4. La cardosina B recombinante según la reivindicación 1 que se ha expresado en *Kluyveromyces lactis*.
5. Ácido nucleico que codifica:
- i. una cardosina B recombinante en donde el dominio de PSI se elimina por completo en comparación con la secuencia de cardosina B de tipo silvestre o en donde el dominio de PSI se reemplaza completamente con un péptido conector de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos;
  - ii. el polipéptido de la SEQ ID NO: 1 o
  - iii. un polipéptido que tiene al menos un 98 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, en donde el polipéptido codificado carece de un dominio de inserto específico vegetal (PSI).
6. Un vector que comprende el ácido nucleico según la reivindicación 5.
7. El vector según la reivindicación 6, que es un vector de expresión de levadura.
8. Una célula de levadura que expresa:
- i. una cardosina B en donde el dominio de PSI se elimina por completo en comparación con la secuencia de cardosina B de tipo silvestre o en donde el dominio de PSI se reemplaza completamente con un péptido conector de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos;
  - ii. el polipéptido de la SEQ ID NO: 1 o
  - iii. un polipéptido que tiene al menos un 98 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, en donde el polipéptido codificado carece de un dominio de inserto específico vegetal (PSI).
9. La célula según la reivindicación 8, en donde la levadura es del género *Kluyveromyces*.
10. Uso de la cardosina B según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el cuajado de la leche.
11. Un método para hacer queso, comprendiendo el método exponer la leche a una cardosina B recombinante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.



**Figura 1**

**>pCBwoPSI (secuencia de procardosina B sin la secuencia de PSI):**

>MVSNGGLLRVGLKRRKVDRLDQLRAHGVHMLGNARKDFGFRRTL RDSSGSGIVAL  
TNRDRTAYYGEIGIGTPPQNFAVIFDTGSSDLWVPSTKCDTSLACVIHPRYDSGDSS  
TYKNGTTASIQYGTGAIVGFYSQDSVEVGLVVEHQDFIETTEEDDTVFLKSEFDG  
ILGLGFQEISAGKAVPVWYNMVNQGLVEEAVFSFWLNARNVDEEEGGELVFGGVDP  
NHFRGNHTYVPVTRKGYWQFEMGDVLIGDKSSGFCAGGCAAADSGTSFFAGPTAI  
ITQINQAIGAKGGGSAESIVDCNGISSMPNIAFTIGSKLFEVTPEQYIYKVGEGEAAT  
CISGFTALDIMSPPQPIWILGDMFMGPYHTVFDYGKLRVGF AEAV

[SEQ ID NO: 1]

**pCAwoPSI (secuencia de procardosina A sin la secuencia de PSI):**

MSDDGLIRIGLKKRVDRLDQLRGRALMEGNARKDFGFRGTVRDSSGSAVVALTND  
RDTSYFGEIGIGTPPQKFTVIFDTGSSVLWVPSSKCSKACRAHSMYESSDSSTYK  
ENGTSGAIYGTGSITGFFSQDSVTIGDLVVEHQDFIETDEADNVFLHRLFDGILGLS  
FQTISVPVWYNMVNQGLVKERRFSFWLNARNVDEEEGGELVFGGLDPNHFRGDHT  
YVPVTYQYYWQFGIGDVLIGDKSTGFCAPGCQAFADSGTSLLSGPTAIVTQINHAIG  
ANGGGGSEELQVDCNTLSSMPNVSFTIGGKGFGLTPEQYILKVGKGEATQCISGFT  
AMDATLLGPLWILGDVFMRPYHTVFDYGNLLVGF AEAA

[SEQ ID NO: 2]

**pCA secuencia de PSI:**

VMNQCKTVVSRVGRDIIEMLRSKIQPKICSHMKLCTFDGARDVSSIIESVVDKNN  
DKSSGGIHDCTFCEMAVVWMQNEIKQSETEDNIINYANELCEHLSTS

[SEQ ID NO: 3]

**pCB secuencia de PSI:**

VLNQCKTLVGQYGKNNMVQMLTSEVQPKICSHMKLCTFDGAHDVRSMIESVVDK  
NNDKSSGGEICTFCEMALVRMQNEIKRNETEDNIINHVNVEVCDQLPTS

[SEQ ID NO: 4]

**pCB (secuencia de procardosina B):**

MVSNGGLLRVGLKRRKVDRLDQLRAHGVHMLGNARKDFGFRRTL RDSSGSGIVALT  
NDRDRTAYYGEIGIGTPPQNFAVIFDTGSSDLWVPSTKCDTSLACVIHPRYDSGDSS  
YKNGTTASIQYGTGAIVGFYSQDSVEVGLVVEHQDFIETTEEDDTVFLKSEFDGI  
LGLGFQEISAGKAVPVWYNMVNQGLVEEAVFSFWLNARNVDEEEGGELVFGGVDP  
NHFRGNHTYVPVTRKGYWQFEMGDVLIGDKSSGFCAGGCAAADSGTSFFAGPTAI  
ITQINQAIGAKGVLNQCKTLVGQYGKNNMVQMLTSEVQPKICSHMKLCTFDGAHD  
VRSMIESVVDKNNNDKSSGGEICTFCEMALVRMQNEIKRNETEDNIINHVNVEVCDQLP  
TSSAESMVDCNGISSMPNIAFTIGSKLFEVTPEQYIYKVGEGEAATCISGFTALDIMS  
PQGPPIWILGDMFMGPYHTVFDYGKLRVGF AEAV

[SEQ ID NO: 5]

## Figura 2

**pCA (secuencia de procardosina A):**

MSDDGLIRIGLKKRKVDRIDQLRGRRALMEGNARKDFGFRGTVRDSGS AVVALTND  
RDTSYFGEIGIGTPPQKFTVIFDTGSSVLWVPSSKCINSKACRAHSMYESSDSSTYK  
ENGTSGAIIYGTGSITGFFSQDSVTIGDLVVKEQDFIEATDEADNVFLHRLFDGILGLS  
FQTISVPVWYNMVNQGLVKERRFSFWLNRNVDEEEGGELVFGGLDPNHFRGDHT  
YVPVTYQYYWQFGIGDVLIGDKSTGFCAPGCQAFADSGTSLLSGPTAIVTQINHAIG  
ANGVMNQCKTVVSRVGRDIIEMLRSKIQPKICSHMKLCTFDGARDVSSIIESVVD  
KNNDKSSGGIHDEMCTFCEMAVVWMQNEIKQSETEDNIINYANELCEHLSTSSEEL  
QVDCNTLSSMPNVSFTIGGKKFGLTPEQYILKVGKGEATQCISGFTAMDATLLGPLW  
ILGDVFMRPYHTVFDYGNLLVGFAEAA

[SEQ ID NO: 6]

**pCB-XhoI**

CTCGAGAAAAGAATGGTCTCCAACGGCGGATTGCTTC

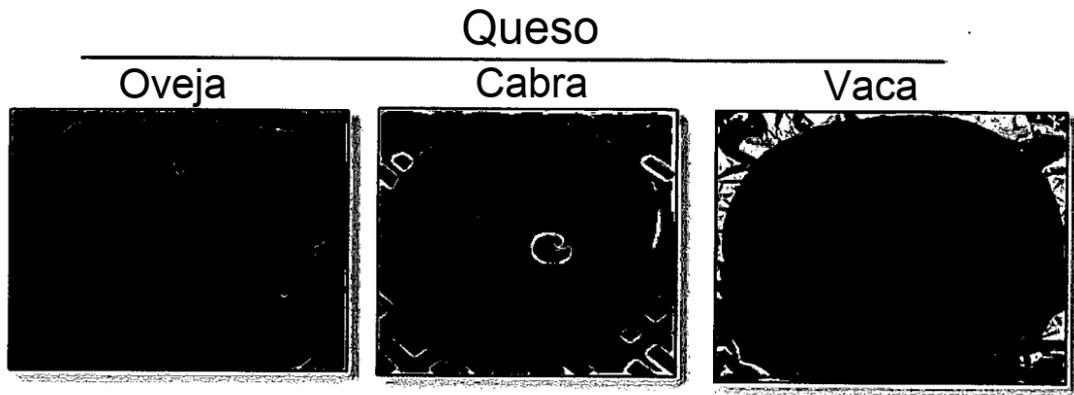
[SEQ ID NO:7]

**pCB-SalI**

GTCGACTCAAACGCTTCTGCAAATCCCACTCGTAAC

[SEQ ID NO:8]

**Figura 2 (continuación)**



**Figura 3**

# nCB frente a pCB $\Delta$ PSI

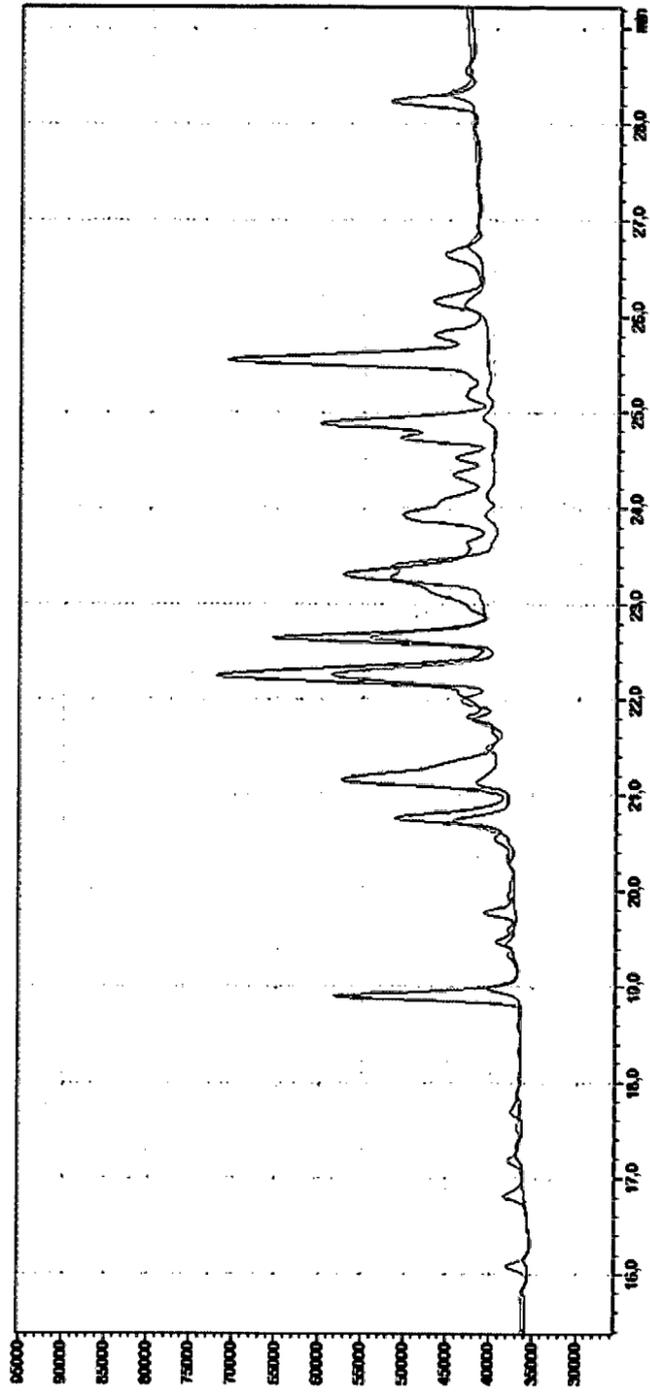
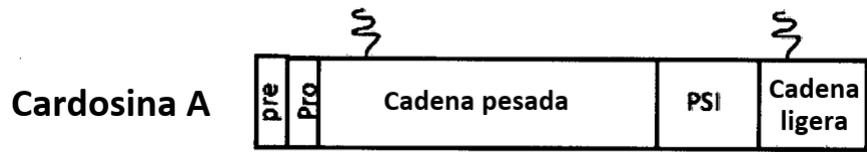


Figura 4



**Figura 5A**

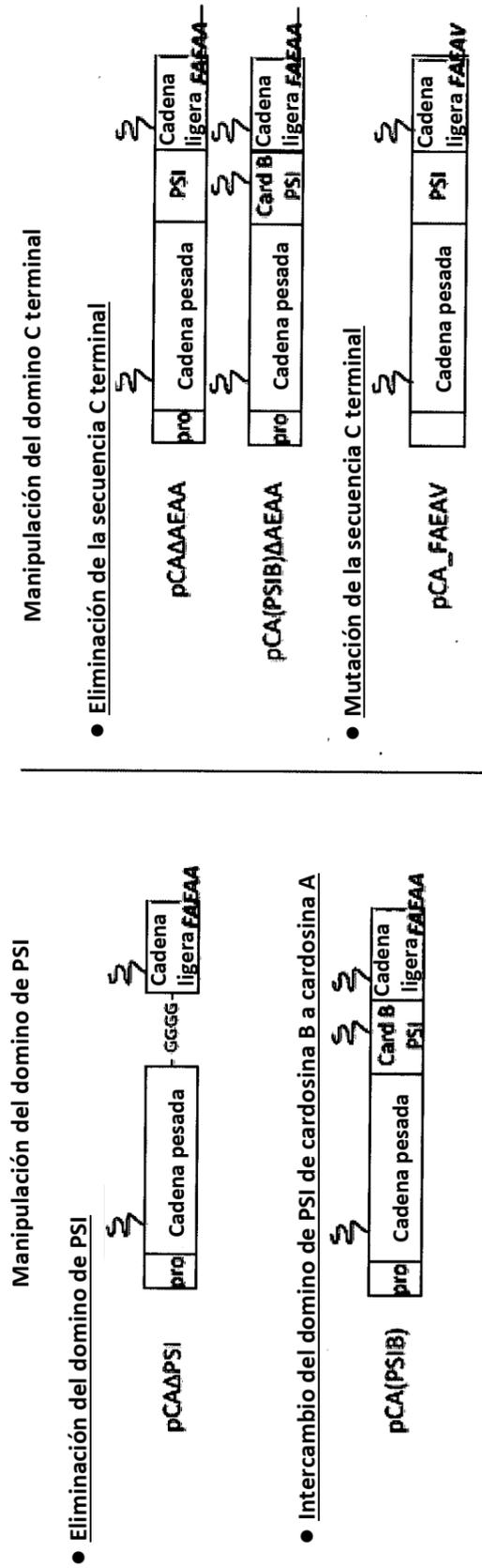


Figura 5B

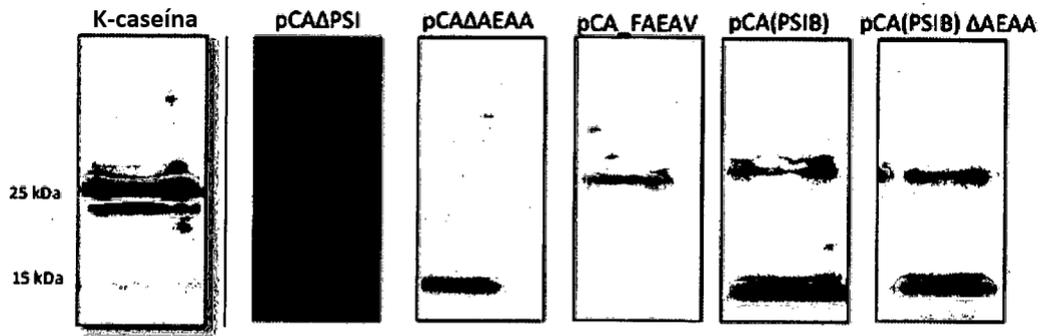


Figura 6

	Cadena pesada	Región de PSI		Cadena ligera
	cardosina B	NQAIGAKGVLNQCKTLVGOYGKNNVQMLTSEVQPKICSHMKLICTFDGAHDVRSMIESV		cardosina B
	pCBAPSI	NQAIGAKG.GGG		pCBAPSI
Grupo I	pCBAPSI_4G	NQAIGAKG.GGGG		pCBAPSI_4G
	pCBAPSI_6G	NQAIGAKG.GGGGG		pCBAPSI_6G
	pCBAPSI_NQG	NQAIGAKG.NQG		pCBAPSI_NQG
Grupo II	pCBAPSI_Aconector	NQAIGAKG		pCBAPSI_Aconector
	pCBAPSI_2C	NQAIGAKGVLNQCKTLVGOY		pCBAPSI_2C
Grupo III	pCBAPSI_Abucle	NQAIGAKGVLNQCKTLVGOYGKNNVQMLTSEVQPKICSHMKLICTFDGA		pCBAPSI_Abucle
	cardosina B	VDKNNDKSSGGEICTFCEMALVRMONEIKRNETEDNIINHVNVEVCDQLPTSSAESIVDCN		cardosina B
	pCBAPSI			pCBAPSI
Grupo I	pCBAPSI_4G			pCBAPSI_4G
	pCBAPSI_6G			pCBAPSI_6G
	pCBAPSI_NQG			pCBAPSI_NQG
Grupo II	pCBAPSI_Aconector			pCBAPSI_Aconector
	pCBAPSI_2C	ETEDNIINHVNVEVCDQLPTSSAESIVDCN		pCBAPSI_2C
Grupo III	pCBAPSI_Abucle	GGEICTFCEMALVRMONEIKRNETEDNIINHVNVEVCDQLPTSSAESIVDCN		pCBAPSI_Abucle

Figura 7

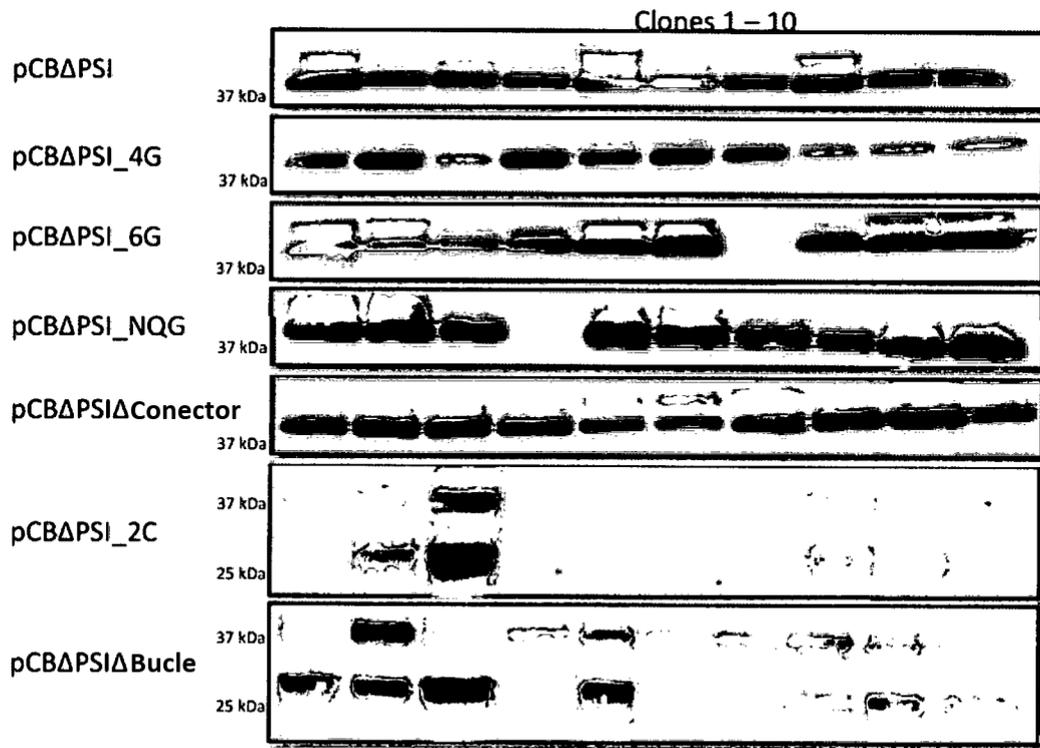


Figura 8

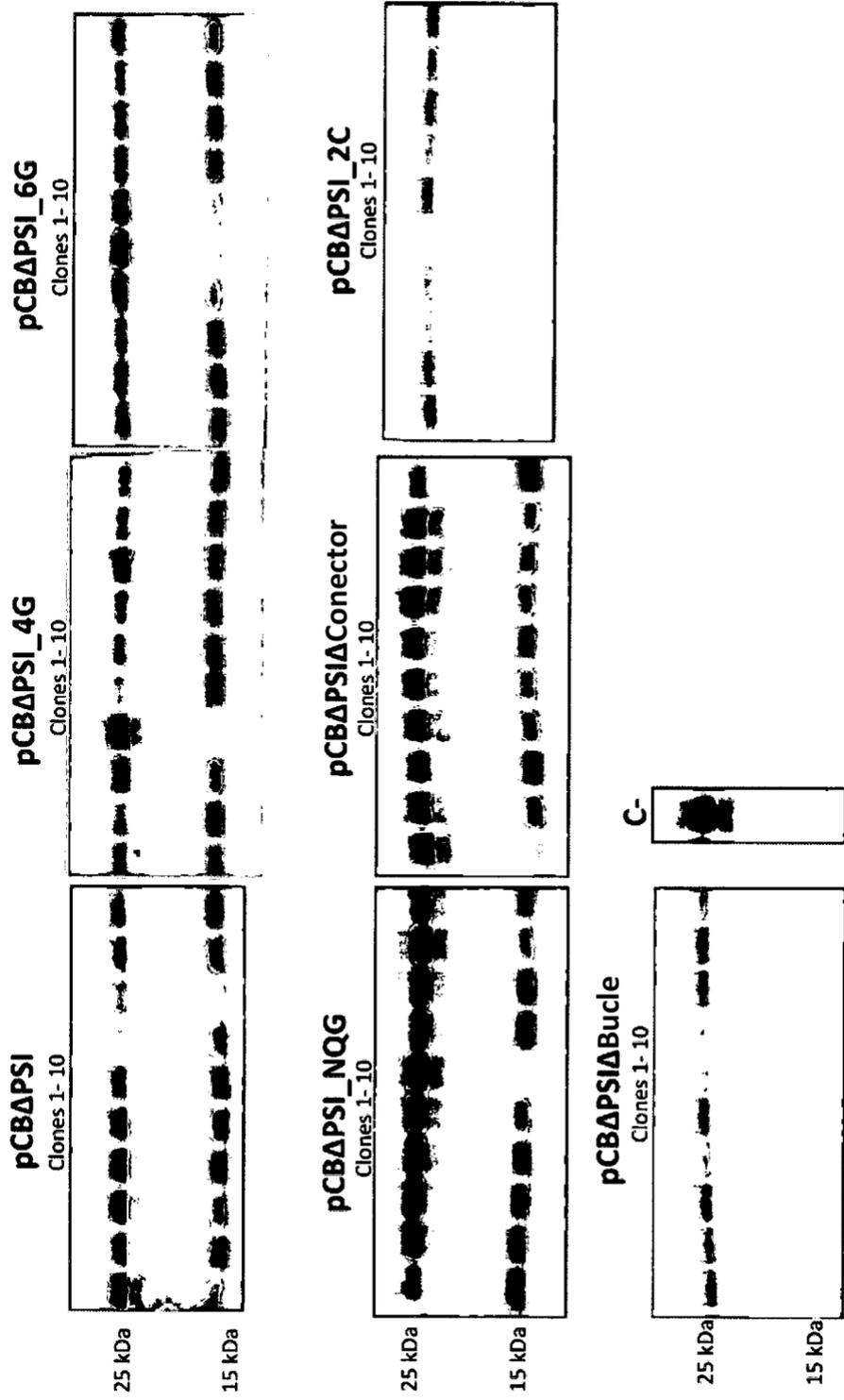


Figura 9

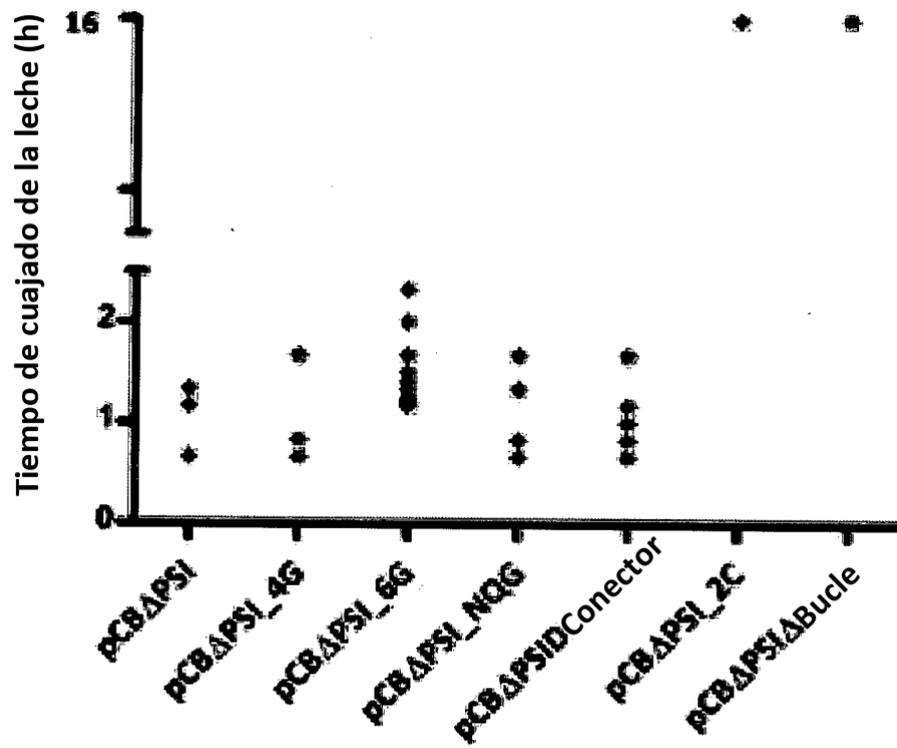


Figura 10

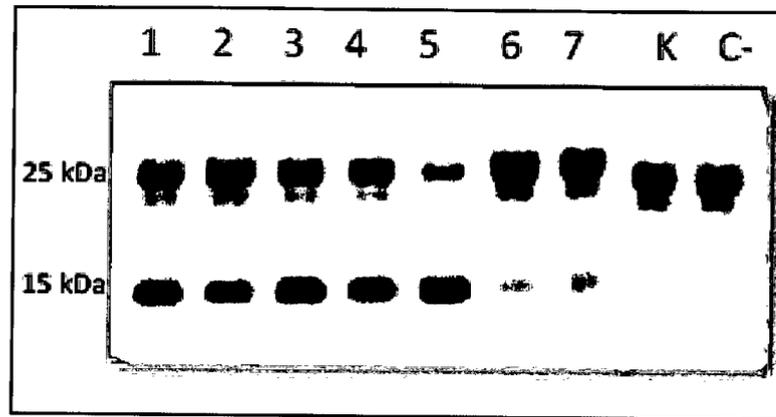
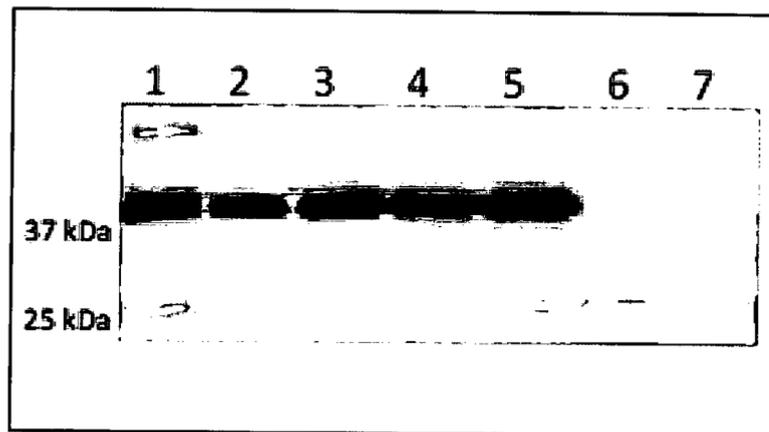


Figura 11A



- 1: pCBΔPSI
- 2: pCBΔPSI\_4G
- 3: pCBΔPSI\_6G
- 4: pCBΔPSI\_NQG
- 5: pCBΔPSIΔConector
- 6: pCBΔPS\_2C
- 7: pCBΔPSΔBucle
- K: k-caseína no hidrolizada
- C-: células de levadura no transformadas

Figura 11B