

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 519 466**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/82** (2006.01)

**C12N 15/52** (2006.01)

**A23L 1/10** (2006.01)

**A23L 1/214** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2008 E 08717506 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.07.2014 EP 2137307**

54 Título: **Asparaginasas termoestables**

30 Prioridad:

**09.03.2007 EP 07103862**

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

**07.11.2014**

73 Titular/es:

**NOVOZYMES A/S (100.0%)  
Krogshøjvej 36  
2880 Bagsvaerd, DK**

72 Inventor/es:

**MATSUI, TOMOKO;  
FRIIS, ESBEN PETER y  
YAMAGISHI, AKIHIKO**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 519 466 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

Asparaginasas termoestables

5 Campo de la invención

[0001] La invención se refiere a nuevas asparaginasas que tienen propiedades mejoradas, preferiblemente termotolerancia mejorada, tal como actividad mejorada a altas temperaturas y/o termoestabilidad mejorada. La invención también se refiere a las secuencias de ADN que codifican tales asparaginasas mejoradas, su producción en una célula huésped recombinante, al igual que métodos del uso de las asparaginasas, en particular para reducir la acrilamida en alimentos. La invención además se refiere a métodos para generar y preparar variantes de asparaginasa que tengan propiedades mejoradas.

15 Antecedentes de la invención

[0002] Se sabe que la acrilamida se forma en diferentes materiales alimenticios durante el calentamiento a altas temperaturas. La formación de acrilamida se ha asignado a una reacción de Maillard donde la asparagina es uno de los reactivos. Se sabe bien que la formación de acrilamida en productos alimenticios calentados se puede reducir mediante un tratamiento que reduce la cantidad de asparagina en los materiales alimenticios, tal como sometiendo los materiales alimenticios a la acción de la enzima asparaginasa (véase, por ejemplo, la WO2004/026042 (Frito-Lay North America, Inc.)).

[0003] Varias asparaginasas microbianas se han identificado, véase, por ejemplo, la WO2004/030468 (DSM), que revela la secuencia de una asparaginasa derivada de *Aspergillus niger*, o la WO2004/032648 (Novozymes A/S) que divulga secuencias de asparaginasas derivadas de *Aspergillus oryzae* y *Penicillium citrinum*. La WO2004/032648 también menciona las secuencias de aminoácidos de asparaginasas de *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus nidulans*. La secuencia de aminoácidos de una asparaginasa de *Aspergillus terreus* se puede obtener de la base de datos UniProt (número de entrada: q0cwj1).

[0004] La secuencia de aminoácidos y la estructura cristalina de una L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* se han descrito (Jacek Lubkowski, Mirosława Dauter, Khosrow Aghaiypour, Alexander Wlodawera and Zbigniew Dauter (2003) Atomic resolution structure of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase. Acta Cryst. D, 59, 84-92).

[0005] Un método para diseñar proteínas con termoestabilidad mejorada utilizando 3-isopropilmalato deshidrogenasa de *Thermus thermophilus* como enzima modelo se ha descrito (Watanabe, K. *et al.* (2006) J. Mol. Biol. 355,664- 674).

[0006] La EP-A-1704782 divulga un proceso para la producción de un producto alimenticio que implica al menos un paso de calentamiento, que comprende la adición de una o varias enzimas a una forma intermedia de dicho producto alimenticio en dicho proceso de producción, por lo cual la enzima se añade antes de dicho paso de calentamiento en una cantidad que es eficaz para reducir el nivel de aminoácidos que están presentes en dicha forma intermedia de dicho producto alimenticio cuyos aminoácidos están implicados en la formación de acrilamida durante dicho paso de calentamiento. Una asparaginasa de *Aspergillus niger* está descrita.

[0007] Para algunas aplicaciones, las asparaginasas que tienen propiedades mejoradas se prefieren, tales como las asparaginasas que tienen termotolerancia mejorada, por ejemplo, termoestabilidad mejorada o actividad mejorada a altas temperaturas.

[0008] Es un objeto de la presente invención proporcionar asparaginasas alternativas, en particular asparaginasas nuevas que tengan propiedades mejoradas. Tales asparaginasas mejoradas son adecuadas para su uso, por ejemplo, en la producción de productos alimenticios.

Resumen de la invención

[0009] Los presentes inventores han modelado la estructura tridimensional de una asparaginasa de *Aspergillus oryzae* basada en la estructura publicada de una enzima homóloga de *Erwinia chrysanthemi*. Basándose en la estructura modelada, los inventores han identificado residuos de aminoácidos importantes para mejorar las propiedades de la asparaginasa, especialmente la termotolerancia.

[0010] Además, los presentes inventores han predicho una secuencia de asparaginasa ancestral inferida y a partir de esta secuencia han identificado otros residuos de aminoácidos importantes para mejorar las propiedades de una asparaginasa, especialmente la termotolerancia.

[0011] Basándose en tales consideraciones funcionales y estructurales, se construyeron variantes de asparaginasa que tenían residuos de aminoácidos modificados en las posiciones identificadas y que tenían propiedades fisicoquímicas alteradas, actividad relativa especialmente mejorada a altas temperaturas y/o termoestabilidad mejorada.

[0012] Por consiguiente, la presente invención se refiere a un método para preparar un polipéptido que comprende:

(a) proporcionar una secuencia de aminoácidos de un polipéptido original que tenga actividad de asparaginasa;

(b) seleccionar al menos un residuo de aminoácidos en una posición en la secuencia que se corresponda con cualquiera de las posiciones: 54, 57, 70, 83, 84, 86, 102, 137, 164, 196, 201, 228, 260, 262, 278, 283, 290, 307, 312, 323, 327, 334, 336, 337, 349, 351, 353, 366 y/o 375 de SEC ID nº: 1;

(c) modificar la secuencia por substitución del residuo de aminoácido seleccionado;

(d) producir un polipéptido variante que tenga la secuencia modificada;

(e) probar el polipéptido variante para actividad de asparaginasa y termotolerancia; y

(f) seleccionar un polipéptido variante que tenga actividad de asparaginasa y termotolerancia más altas en comparación con el polipéptido original.

[0013] La invención también se refiere a asparaginastas termotolerantes, que se pueden obtener mediante tal método.

[0014] Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido que:

(a) tiene actividad de asparaginasa;

(b) tiene al menos 70% de identidad con los aminoácidos 80 a 378 de SEC ID nº: 1;

(c) comprende al menos una de las siguientes sustituciones: 54I, 57L, 70H/K, 84D, 86P, 102D, 137S, 164D, 196I, 201Q, 228V, 260K, 262D, 278H/Q, 283C, 290V, 307A, 312Y, 323R, 327V, 334F, 336C/G/L, 337F/I, 351A, 366P y/o 375T, donde cada posición corresponde a una posición de los aminoácidos 1 a 378 de SEC ID nº: 1; y

(d) muestra una actividad de asparaginasa residual después de tratamiento térmico de al menos 50% de la actividad de asparaginasa sin tratamiento térmico, donde el tratamiento térmico es incubación con pH 6 a una temperatura de al menos 64°C durante 20 minutos.

[0015] La presente invención también se refiere a un polipéptido que:

(a) tiene actividad de asparaginasa;

(b) tiene al menos 70% de identidad con los aminoácidos de 80 a 378 de SEC ID nº: 1;

(c) comprende al menos una de las siguientes sustituciones: 54I, 57L, 70H/K, 84D, 86P, 102D, 137S, 164D, 196I, 201Q, 228V, 260K, 262D, 278H/Q, 283C, 290V, 307A, 312Y, 323R, 327V, 334F, 336C/G/L, 337F/I, 351A, 366P y/o 375T, donde cada posición corresponde a una posición de los aminoácidos 1 a 378 de SEC ID nº: 1; y

(c) muestra una actividad de asparaginasa a pH 6 que es al menos un 25% más alta a 65°C que a 37°C.

[0016] En otros aspectos, la invención se refiere a asparaginastas nuevas que comprenden diferencias en la secuencia de aminoácidos en comparación con la SEC ID nº: 1 en posiciones identificadas como importantes para mejorar la termotolerancia de la enzima.

[0017] Por consiguiente, la presente invención en un aspecto se refiere a un polipéptido que:

(a) tiene actividad de asparaginasa;

(b) tiene al menos 80% de identidad con los aminoácidos 80 a 378 de SEC ID nº: 1;

(c) comprende una sustitución en una posición que se corresponde con cualquiera de las posiciones 54, 57, 70, 83, 84, 86, 102, 137, 164, 196, 201, 228, 260, 262, 278, 283, 290, 307, 312, 323, 327, 334, 336, 337, 349, 351, 353, 366 y/o 375 en SEC ID nº: 1; y

(d) muestra una actividad de asparaginasa residual después de tratamiento térmico de al menos 50% de la asparaginasa sin tratamiento térmico, donde el tratamiento térmico es incubación con pH 6 a una temperatura de al menos 64°C durante 20 minutos.

[0018] Las diferencias de los aminoácidos se pueden obtener modificando una secuencia original, por ejemplo, por mutagénesis dirigida al sitio. No obstante, también se pueden encontrar en polipéptidos de origen natural, que nacen con tales diferencias de aminoácidos en comparación con la SEC ID nº: 1.

[0019] La presente invención también se refiere a secuencias de ácidos nucleicos aisladas que codifican las asparaginases y a constructos de ácidos nucleicos, vectores de expresión y células huésped que comprenden las secuencias de ácidos nucleicos, al igual que métodos para producir y utilizar las asparaginases.

Breve descripción de las figuras

[0020]

La figura 1 es un alineamiento múltiple de asparaginases derivadas de *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Penicillium citrinum*, *Aspergillus terreus* y *Aspergillus niger*.

La figura 2 muestra datos de simulación de dinámica molecular para tres temperaturas de simulación (300K, 400K, 500K) y para los cuatro monómeros de la estructura tetramérica modelada de la asparaginasa de *A. oryzae*. Los rangos de residuo que tienen valores de rmsd (desviación cuadrática media) altos (con respecto al valor medio para esa temperatura) se identifican como regiones móviles y son de este modo objetivos de interés para mutaciones estabilizantes.

La figura 3 muestra en una estructura modelo de la asparaginasa de *Aspergillus oryzae* que las asparaginases tetraméricas tienen 3 ejes de simetría binaria.

La figura 4 muestra un archivo de parámetros para la simulación de dinámica molecular.

La figura 5 muestra un archivo de parámetros para la simulación de dinámica molecular.

La figura 6 muestra un árbol filogenético inferido por el método de probabilidad máxima aplicado en el ejemplo 6.

Descripción detallada de la invención

Asparaginases nuevas

[0021] Los polipéptidos de la presente invención tienen actividad de asparaginasa. Preferiblemente, tienen secuencias de aminoácidos que se pueden alinear con cualquiera de las SEC ID N°: 1 a 6.

[0022] SEC ID n°: 1 muestra la secuencia de aminoácidos de una asparaginasa de *Aspergillus oryzae* y el sistema de numeración usado en el contexto de la presente invención. La secuencia de aminoácidos y la secuencia de ADN que la codifica se publicaron previamente como SEC ID n°: 2 y SEC ID n°: 1 de WO2004/032648.

[0023] SEC ID n°: 2 muestra la secuencia de aminoácidos de una asparaginasa de *Aspergillus niger*. La secuencia de aminoácidos y la secuencia de ADN que la codifica se publicaron previamente como SEC ID n°: 3 y SEC ID n°: 2 en la WO2004/030468.

[0024] SEC ID n°: 3 muestra la secuencia de aminoácidos de una asparaginasa de *Aspergillus fumigatus* (previamente publicada como SEC ID n°: 6 en la WO2004/032648). SEC ID n°: 4 muestra la secuencia de aminoácidos de una asparaginasa de *Aspergillus nidulans* (previamente publicada como SEC ID n°: 4 en la WO2004/032648). SEC ID n°: 5 muestra la secuencia de aminoácidos de una asparaginasa de *Penicillium citrinum* (previamente publicada como SEC ID n°: 12 en la WO2004/032648). SEC ID n°: 6 muestra la secuencia de aminoácidos de una asparaginasa de *Aspergillus terreus* (obtenida de la base de datos UniProt, n° de entrada: q0cwj1).

[0025] Los polipéptidos de la presente invención se pueden procesar parcialmente o completamente de forma postraducciona. Por ejemplo, se pueden trincar de forma N-terminal en posiciones diferentes, de modo que se encontrarán secuencias N-terminales diferentes. La asparaginasa de *Aspergillus oryzae* de tipo salvaje, cuando se sobreexpresa en *Aspergillus oryzae*, se ha descubierto que se procesa de forma heterogénea, de manera que al menos cuatro secuencias de N-terminal se encontraron en una muestra purificada, correspondientes a los polipéptidos truncados en los aminoácidos 27-378, 30-378, 75-378 o 80-378. Los polipéptidos de la presente invención se pueden trincar posiblemente en las posiciones correspondientes o se pueden trincar en otras posiciones. Los polipéptidos de la presente invención pueden así, por ejemplo, truncarse inmediatamente antes de la posición correspondiente a cualquiera de las posiciones 27, 30, 75 o 80 de SEC ID n°: 1. En este contexto, lo que se entiende por "inmediatamente anterior" es que el truncamiento tiene lugar al lado N-terminal de la posición mencionada. Los polipéptidos de la presente invención pueden así tener un extremo N-terminal correspondiente, por ejemplo, a cualquiera de las posiciones 27, 30, 75 u 80 de SEC ID n°: 1.

[0026] Los polipéptidos de la presente invención pueden tener una secuencia de aminoácidos que tenga más del 50% de identidad con SEC ID n°: 1, o un fragmento de la misma, preferiblemente más del 60%, tal como más del 70% o del 80%, particularmente más del 90%, especialmente más del 95%, por ejemplo más del 98%. El fragmento de SEC ID n°: 1 puede, por ejemplo, consistir en los aminoácidos 27- 378, 30-378, 75-378 o 80-378.

- [0027] En general, para el propósito de la presente invención, cuando se hace referencia a un fragmento de un polipéptido, lo que se entiende es un polipéptido o cadena de aminoácidos que consiste en al menos 100, tal como al menos 150 o al menos 200 o 300 aminoácidos. Un fragmento preferido en el contexto de la presente invención comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos desde la posición que corresponde a la posición 80 de SEC ID n°: 1 en el C-terminal, por ejemplo los aminoácidos 80-378 de SEC ID n°: 1, los aminoácidos 80-378 de SEC ID n°: 2, los aminoácidos 80-374 de SEC ID n°: 3, los aminoácidos 80-378 de SEC ID n°: 4, los aminoácidos 80-379 de SEC ID n°: 5 o los aminoácidos 80-375 de SEC ID n°: 6.
- [0028] En una forma de realización preferida, los polipéptidos de la presente invención tienen una secuencia de aminoácidos que tiene de 1 a 50, tal como 1 a 40, 1 a 30, 1 a 20 o 1 a 10 diferencias de aminoácidos en comparación con SEC ID n°: 1 o un fragmento de la misma.
- [0029] En otro aspecto, los polipéptidos de la presente invención tienen una secuencia de aminoácidos que tiene más del 50% de identidad con SEC ID n°: 2, o un fragmento de la misma, preferiblemente más del 60%, tal como más del 70% o el 80%, particularmente más del 90%, especialmente más del 95%, por ejemplo más del 98%.
- [0030] En otro aspecto, los polipéptidos de la presente invención tienen una secuencia de aminoácidos que tiene más del 50% de identidad con cualquiera de SEC ID n°: 3 a 6, o un fragmento de la misma, preferiblemente más del 60%, tal como más del 70% o el 80%, particularmente más del 90%, especialmente más del 95%, por ejemplo más del 98%.
- [0031] En un aspecto preferido, los polipéptidos de la presente invención son eucarióticas, es decir derivados, obtenidos u originados de un organismo eucariota. En un aspecto más preferido, los polipéptidos se derivan, obtienen u originan de *Aspergillus*.
- [0032] Los polipéptidos de la presente invención pueden mostrar una termotolerancia alta, por ejemplo pueden tener una termoestabilidad alta o una alta actividad de asparaginasa relativa a alta temperatura.
- [0033] En un aspecto, los polipéptidos de la presente invención pueden ser termoestables o tener una termoestabilidad alta. La termoestabilidad se puede determinar como la actividad de asparaginasa residual después de tratamiento térmico dividida por la actividad de asparaginasa sin tratamiento térmico. El tratamiento térmico puede ser de incubación en pH 6, o alrededor de pH 6, a alta temperatura durante, por ejemplo, 10, 20, 30 o 40 minutos. La actividad de asparaginasa sin tratamiento térmico se puede determinar en este contexto como la actividad de asparaginasa de una muestra que se ha incubado a 4°C en el mismo tampón y durante el mismo tiempo que la muestra que está tratada con calor, o puede ser la actividad de asparaginasa antes del tratamiento térmico.
- [0034] Los polipéptidos de la presente invención pueden mostrar una actividad de asparaginasa residual de al menos 90%, tal como al menos 80%, al menos 70%, al menos 60%, al menos 50% o al menos 40%, tras la incubación en pH 6 a alta temperatura durante un periodo de tiempo, por ejemplo 20 minutos, en comparación con la actividad de asparaginasa sin tratamiento térmico.
- [0035] Alta temperatura en el contexto de la presente invención se puede referir, por ejemplo, a 55°C, 58°C, 60°C, 61°C, 62°C, 63°C, 64°C, 65°C, 66°C, 67°C, 68°C, 69°C, 70°C, 72°C o 75°C.
- [0036] La actividad de asparaginasa se puede determinar mediante cualquier método conocido en la técnica. Se puede determinar mediante la incubación de la enzima con L-asparaguina e hidroxilamina en un tampón de fosfato potásico a pH 6 durante 20 minutos seguido de la reacción de acoplamiento con FeCl<sub>2</sub> y midiendo A490, como se describe en el ejemplo 4. La incubación puede ser en cualquier temperatura adecuada, por ejemplo 55°C.
- [0037] En otro aspecto, los polipéptidos de la presente invención pueden tener una alta actividad de asparaginasa relativa a alta temperatura en comparación con una temperatura de referencia, por ejemplo, 37°C, 40°C, 45°C o 50°C. La actividad de asparaginasa a alta temperatura y, por ejemplo, 37°C se puede determinar como se ha descrito anteriormente, donde la incubación con asparagina se realiza a alta temperatura y 37°C, respectivamente. La actividad de asparaginasa a alta temperatura dividida por la actividad a 37°C puede ser de al menos 110%, preferiblemente al menos 120%, tal como al menos 125%, 130%, 140%, 150%, 170% o 200%, más preferiblemente al menos 250%, tal como al menos 300%, e incluso más preferiblemente al menos 500% o al menos 700%.
- [0038] En algunos aspectos, los polipéptidos de la presente invención comprenden una diferencia de aminoácidos en comparación con una secuencia de referencia, por ejemplo SEC ID n°: 1, en una o más posiciones especificadas. Tales posiciones se pueden identificar por un método descrito en la presente. Una diferencia de aminoácidos en el contexto de la presente invención puede ser la sustitución del residuo de aminoácidos en la posición especificada. La sustitución puede referirse a sustitución por otro aminoácido de origen natural.
- [0039] La diferencia de aminoácidos puede ser de origen natural, es decir encontrada en una asparaginasa de tipo salvaje de origen natural que sea menos de 100% idéntica a SEC ID n°: 1, o se puede introducir, por ejemplo, mediante

ingeniería de proteína, tal como por mutagénesis dirigida al sitio, por ejemplo, realizada para mejorar las propiedades de una asparaginasa original.

[0040] Los polipéptidos de la presente invención pueden ser variantes de un polipéptido original, en cuyo caso una diferencia de aminoácidos puede referirse a una diferencia en la secuencia de aminoácidos en una posición específica de la variante, en comparación con la secuencia original. En este caso, la diferencia de aminoácidos también se puede denominar modificación de aminoácidos.

[0041] Los polipéptidos de la invención, que comprenden diferencias de aminoácidos en posiciones especificadas comparados con SEC ID n°: 1, o comparados con un polipéptido original, pueden comprender diferencias de aminoácidos adicionales además de las diferencias de aminoácidos descritas aquí.

Asparaginasa original

[0042] El polipéptido original según la presente invención puede ser una asparaginasa clasificada como EC 3.5.1.1 según la nomenclatura enzimática (disponible en <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme>). Puede ser una asparaginasa eucariótica, por ejemplo una asparaginasa fúngica, tal como una asparaginasa fúngica filamentosa, por ejemplo nativa de una cepa de *Aspergillus*, en particular *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus niger*.

[0043] La asparaginasa original puede tener una secuencia de aminoácidos que sea al menos 50% (particularmente al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 98%) homóloga de cualquiera de SEC ID n°: 1, SEC ID n°: 2, SEC ID n°: 3, SEC ID n°: 4, SEC ID n°: 5 o SEC ID n°: 6. La asparaginasa original puede ser particularmente una que se pueda alinear con cualquiera de estas secuencias. En un aspecto preferido, la asparaginasa original puede tener la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEC ID n°: 1, SEC ID n°: 2, SEC ID n°: 3, SEC ID n°: 4, SEC ID n°: 5 o SEC ID n°: 6 u homólogas de cualquiera de éstas. En un aspecto más preferido, la asparaginasa original puede tener la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 1 o SEC ID n°: 2 u homólogas de cualquiera de estas, preferiblemente SEC ID n°: 1.

Nomenclatura para diferencias de aminoácidos

[0044] La especificación y las reivindicaciones se refieren a los aminoácidos por sus códigos de una sola letra. Un aminoácido particular de una secuencia se identifica por su código de una sola letra y su posición, por ejemplo M1 indica Met (metionina) en la posición 1, es decir en el N-terminal.

[0045] La nomenclatura que se usa aquí para definir sustituciones es básicamente como se describe en la WO 92/05249. Así, G82P indica sustitución de G (Gly) en la posición 82 con P (Pro). D223N/L Indica sustitución de D (Asp) en la posición 223 con N (Asn) o L (Leu). Un signo más (+) entre sustituciones, por ejemplo 137S+228V significa "y", es decir, que estas dos sustituciones únicas se combinan en una y la misma asparaginasa.

[0046] Una sustitución abarca una sustitución en cualquiera de los otros diecinueve aminoácidos naturales, o en otros aminoácidos, tales como aminoácidos no naturales. Por ejemplo, una sustitución del aminoácido T en la posición 71 incluye cada uno de las siguientes sustituciones: 71 A, 71 C, 71 D, 71 E, 71 F, 71 G, 71 H, 71 I, 71 K, 71 L, 71 M, 71 N, 71 P, 71 Q, 71 R, 71 S, 71 V, 71 Y y 71 Y. Estas sustituciones pueden también designarse T71A, T71 C, T71 D, etc. Lo mismo se aplica por analogía para cada una y a todas las diferencias de aminoácidos o sustituciones de aminoácidos mencionadas aquí, para incluir específicamente la sustitución de cualquier otro aminoácido.

[0047] Una inserción en una posición específica puede significar la inserción de uno o varios residuos de aminoácidos adicionales adyacentes al residuo de aminoácidos en esa posición. Adyacente a se puede referir en este contexto a cualquier lado, es decir, al lado N-terminal o al lado C-terminal, es decir, antes o después del residuo de aminoácido presente en esa posición en la secuencia de referencia.

[0048] La inserción de un residuo de aminoácido adicional, por ejemplo Lys, en una posición específica, por ejemplo después de Gly en la posición 82, se designa, por ejemplo, G82GK.

[0049] Cuando se designa una diferencia de aminoácidos específica, el residuo de aminoácido de la secuencia de referencia puede o no especificarse. Por ejemplo, una sustitución 96I indica una sustitución en la posición correspondiente a la posición 96 de, por ejemplo, SEC ID n°: 1 para I (Ile) sin tener en cuenta qué aminoácido está presente en la posición 96 de la secuencia de referencia. Si la secuencia de referencia es SEC ID n°: 1, una sustitución 96I también se puede designar V96I.

Homología y alineamiento

[0050] Para fines de la presente invención, el alineamiento de dos secuencias de aminoácidos se puede determinar usando el programa Needle del paquete EMBOSS (Rice, P. Longden, I. and Bleasby, A (2000) EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite Trends in Genetics 16, (6) pp276-277; <http://emboss.org>) versión 2.8.0. El programa Needle ejecuta el algoritmo de alineamiento global descrito en Needleman, S. B. and Wunsch, C. D. (1970) J.

Mol. Biol. 48, 443-453. La matriz de sustitución usada es BLOSUM62, la penalización de abertura de espacio es 10 y la penalización de extensión de espacio es 0,5.

[0051] El grado de identidad entre las dos secuencias de aminoácidos se calcula como el número de coincidencias exactas en un alineamiento de las dos secuencias, dividido por la longitud de la más corta de las dos secuencias. El resultado se expresa en porcentaje de identidad.

[0052] Para los fines de la presente invención, un alineamiento de dos o más secuencias puede utilizarse para identificar en una secuencia la posición correspondiente (es decir, equivalente) a una posición específica de otra secuencia, por ejemplo una secuencia de referencia, por ejemplo SEC ID n°: 1. Si una posición que se corresponde con una posición específica de SEC ID n°: 1 se debe identificar en cualquiera de SEC ID n°: 2 a 6, se puede usar el alineamiento mostrado en la figura 1. Si una posición que corresponde a una posición específica de SEC ID n°: 1 se debe identificar en cualquiera otra secuencia homóloga, un alineamiento entre SEC ID n°: 1 y la secuencia homóloga se debe hacer como se ha descrito anteriormente, y desde este alineamiento a cada residuo de aminoácido de la secuencia homóloga se puede asignar un número correspondiente con su residuo de aminoácido equivalente en SEC ID n°: 1. En este contexto, una secuencia homóloga es una secuencia que se puede alinear con SEC ID n°: 1.

[0053] Para la gran mayoría de los residuos de aminoácidos de los polipéptidos de la invención, y/o para su uso según la invención, es posible asignar directamente y sin ambigüedad un residuo de aminoácido en la secuencia de aminoácidos 1 a 378 de SEC ID n°: 1 a la que corresponde. La única excepción es residuos de aminoácidos que son adicionales para los aminoácidos 1 a 378 de SEC ID n°: 1. Por ejemplo, se puede ver en la figura 1 que la secuencia de aminoácidos de *A. niger* tiene aminoácidos adicionales S, D, T y A entre S338 y S339 de la secuencia de *A. oryzae*, donde la numeración es según SEC ID n°: 1.

[0054] En el contexto de la presente solicitud, los residuos de aminoácidos de los polipéptidos de la invención se pueden numerar según SEC ID n°: 1. Si los polipéptidos de la invención son variantes de un polipéptido original, los residuos de aminoácidos del original también se pueden numerar según SEC ID n°: 1, de modo que a la posición de cada residuo de aminoácido se puede hacer referencia por el número de su aminoácido correspondiente (equivalente) en SEC ID n°: 1.

Métodos para diseñar variantes de asparaginasa nuevas

[0055] En la presente se describe un método para construir una variante de una asparaginasa original, donde la variante tiene al menos una propiedad alterada en comparación con la asparaginasa original.

[0056] Un método para construir una variante de una asparaginasa original, donde la variante tiene al menos una propiedad alterada en comparación con la asparaginasa original, comprende:

(a) proporcionar una estructura de la asparaginasa original;

(b) analizar la estructura de la asparaginasa original para identificar una parte estructural que comprenda al menos un residuo de aminoácido, que sea importante para alterar dicha propiedad;

(c) construir una variante de la asparaginasa original que comprenda una modificación de al menos un residuo de aminoácido identificado en (b) para alterar dicha propiedad; y

(d) probar la variante de asparaginasa resultante para dicha propiedad.

[0057] Otro método para construir una variante de una asparaginasa original, donde la variante tiene al menos una propiedad alterada en comparación con la asparaginasa original, comprende:

(a) proporcionar una secuencia de la asparaginasa original;

(b) alinear la secuencia de la asparaginasa original con una secuencia de asparaginasa ancestral inferida para identificar al menos un residuo de aminoácido, que es importante para alterar dicha propiedad;

(c) construir una variante de la asparaginasa original que comprenda una modificación de al menos un residuo de aminoácido identificado en (b) para alterar dicha propiedad; y

(d) probar la variante de asparaginasa resultante para dicha propiedad.

[0058] La asparaginasa original que se va a usar en un método de la presente invención puede tener una secuencia de aminoácidos que sea al menos 50% idéntica a SEC ID n°: 1 o a un fragmento de la misma, preferiblemente al menos 60%, 70% o 80% idéntica, más preferiblemente al menos 90% idéntica, tal como al menos 95% o al menos 98% idéntica. El fragmento de SEC ID n°: 1 puede, por ejemplo, consistir en residuos de los aminoácidos 50-378 o 80-378 de SEC ID n°: 1.

[0059] En otro aspecto, la asparaginasa original puede tener una secuencia de aminoácidos que sea al menos 50% idéntica a cualquiera de SEC ID n°: 2 a 6 o un fragmento de cualquiera de estas secuencias, preferiblemente al menos

60%, 70% u 80% idéntica, más preferiblemente al menos 90% idéntica, tal como al menos 95% o al menos 98% idéntica.

[0060] La modificación de al menos un residuo de aminoácidos se realiza de forma convencional mediante modificaciones adecuadas de una secuencia de ADN que codifica el polipéptido original en cuestión.

[0061] La al menos una propiedad alterada del método anterior de la presente invención puede ser, por ejemplo, estabilidad, tal como estabilidad de temperatura o estabilidad dependiente del pH, actividad de temperatura o actividad dependiente del pH, actividad específica, especificidad de sustrato, temperatura óptima superior o inferior, temperatura de inactivación superior o inferior o una capacidad aumentada para reducir la formación de acrilamida durante la producción de alimentos.

[0062] La al menos una propiedad alterada puede ser preferiblemente una termotolerancia más alta en comparación con la termotolerancia de la asparaginasa original, tal como una termoestabilidad más alta o una actividad de asparaginasa relativa más alta a alta temperatura en comparación con la asparaginasa original. Más preferiblemente, la al menos una propiedad alterada puede ser una actividad de asparaginasa relativa más alta que la enzima original a pH 6 a 65°C en comparación con 37°C. O puede ser una actividad de asparaginasa más alta que la enzima original a pH 6 a 65°C. O puede ser una actividad de asparaginasa más alta que la enzima original tras la incubación en alrededor de pH 6 a una temperatura de al menos 64°C durante 20 minutos.

[0063] La termoestabilidad y la actividad de asparaginasa relativa a alta temperatura se pueden determinar como se ha descrito anteriormente en la sección "asparaginasas nuevas".

Métodos para diseñar variantes de asparaginasa nuevas basadas en estructuras 3D

[0064] La estructura de la asparaginasa original que se va a aplicar en un método según la invención se puede proporcionar mediante cualquier medio conocido en la técnica. Puede ser que la estructura se haya determinado ya y se conozca en la técnica, en cuyo caso se puede proporcionar haciendo referencia a la bibliografía. Lo contrario, la estructura se puede determinar por difracción de rayos X o RMN. O se puede proporcionar por modelado de la asparaginasa original para que se use según el método de la invención en la estructura de otra asparaginasa, cuya estructura se ha determinado o modelado previamente.

[0065] La estructura tridimensional publicada de la L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* (Jacek Lubkowski, Mirosława Dauter, Khosrow Aghaiypour, Alexander Wlodawera and Zbigniew Dauter (2003) Atomic resolution structure of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase. Acta Cryst. D, 59, 84-92) se usó para modelar la estructura tridimensional de la asparaginasa de *Aspergillus oryzae*. La estructura de otras asparaginasas se puede modelar de forma análoga.

[0066] El modelo 3D de la asparaginasa de *Aspergillus oryzae* fue construido utilizando la herramienta de modelado por homología "Nest" (Petrey, D., Xiang, X., Tang, C. L., Xie, L., Gimpelev, M., Mitros, T., Soto, C. S., Goldsmith-Fischman, S., Kernysky, A., Schlessinger, A., Koh, I. Y. Y., Alexov, E. and Honig, B. (2003) Using Multiple Structure Alignments, Fast Model Building, and Energetic Analysis in Fold Recognition and Homology Modeling. Proteins: Struc., Func. and Genet. 53:430-435). La estructura de cadena A de la asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi* se usó como plantilla. El alineamiento inferior se usó como una base para la construcción del modelo. Los primeros 49 residuos de los aminoácidos de la secuencia de asparaginasa de *Aspergillus oryzae* no estaban incluidos en el modelo. La estructura tetramérica completa se moldeó por alineación de una copia del modelo de asparaginasa de *Aspergillus oryzae* para cada uno de los monómeros de la estructura de asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi*.

>P1;Ao\_asparaginasa

secuencia: Ao\_asparaginasa:.....

TLPNVTIFATG

GTIAGSSADNTATTGYKAGAVGIQTLIDAVPEMLNVANVAGVQVTNVGSPDITS DILLRL

SKQINEVVCNDPTMAGAVVTHGTDLTLEESAFFLDATVNCRKPVVIVGAMRPSTAI SADGP

LNLLQSVTVAA SPKARDRGALIVMNDRIVS AFYASKTNANTVDTFKAIEMGNLGEVVS NK

PYFFYPVPKP-TGKTEVDIRNITSIPRVDILYSYEDMHNDTLYSAIDNGAKGIVIAGSGS

GSVSTPFSAAMEDITTKHNIPIVASTRTGNGEVPSSAESSQIASGYLNPAKSRVLLGLLL

>P1;Ao\_asparaginasa  
 secuencia: Ao\_asparaginasa:.....  
 TLPNVTIFATG  
 GTIAGSSADNTATTGYKAGAVGIQTLIDAVPEMLNVANVAGVQVTNVGSPDITSDILLRL  
 SKQINEVVCNDPTMAGAVVTHGTDITLEESAFFLDATVNCRKPVVIVGAMRPSTAISADGP  
 LNLLQSVTVAASPKARDRGALIVMNDRIVSAFYASKTNANTVDTFKAIEMGNLGEVVSNNK  
 PYFFYPVPKP-TGKTEVDIRNITSIPRVDILYSYEDMHNDTLYSAIDNGAKGIVIAGSGS  
 GSVSTPFSAAMEDITTKHNIPIVASTRTGNGEVPSSAESSQIASGYLNPASRVLLGLLL

AQGKSIEEMRAVFERIGVA

\*

>P1;107j  
 estructura: 107j::A::A:  
 KLPNIVILATG  
 GTIAGSAATGTQTTGYKAGALGVDTLINAVPEVKKLANVKGEQFSNMASENMTGDVVLKL  
 SQRVNELLARD-DVDGWVITHGTDVVEESAYFLHLTVKSDKPVVFVAAMRPATAISADGP  
 MNLLEAVRVAGDKQSRGRGVMVVINDRIGSARYITKTNASTLDTFRANEEGYLGVIIGNRI  
 YYQNRIDKLHTTRSVFDVRGLTSLPKVDILYGYQDDPEYLYDAAIQHGKGVYAGMGA  
 GSVSVRGIAGMRKALEKG-VVVMRSTRTGNGIVPPDEELPGLVSDSLNPAHARILLMLAL  
 TRTSDPKVIQEYFHTY---

5

\*

[0067] La asparaginasa original se puede modelar en la estructura conocida de la L-asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi*. En otras palabras, la estructura conocida de la asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi*, tal como la estructura de cadena A de la asparaginasa de *Erwinia chrysanthemi*, se usa como una plantilla cuando se modela la estructura de la asparaginasa original.

10

[0068] La asparaginasa original se puede modelar en la estructura tridimensional modelada de los residuos de los aminoácidos 50-378 de SEC ID n°: 1, donde esta estructura se modela como se ha descrito anteriormente.

15

[0069] El análisis de la estructura mencionada en el paso (b) de un método puede implicar un análisis del impacto contemplado de la estructura o parte de la estructura en la función de la enzima. Por ejemplo, cambio en las propiedades electroestáticas, cambio en la hidrofobicidad de superficie o dinámica local alterada. Tales cambios locales pueden llevar a propiedades físicas alteradas de la enzima, tal como la termoestabilidad, estabilidad en presencia de otros componentes químicos (p. ej. surfactantes), perfil de pH, propiedades de adsorción o solubilidad.

20

[0070] La parte estructural que se identifica en el paso (b) del método puede estar compuesta por un residuo de aminoácido. No obstante, en algunos casos, la parte estructural comprende más de un residuo de aminoácido. La parte estructural que se va a modificar puede comprender aminoácidos localizados en una interfaz entre diferentes subunidades de un multímero, por ejemplo un dímero o un tetrámero, de una estructura de bucle, cerca del sitio de unión al sustrato, o similar. La parte estructural que se va a modificar es preferiblemente una que en la enzima plegada se cree que contribuye al perfil de estabilidad de temperatura de la enzima, o por el contrario que es responsable de las propiedades de la asparaginasa.

25

[0071] A continuación se describen conceptos específicos que se pueden aplicar en el método y sugerencias específicas de variantes para su diseño usando los diferentes conceptos. Modificaciones de aminoácidos específicas se

30

sugieren principalmente con el propósito de mejorar la actividad a altas temperaturas y/o la termoestabilidad; no obstante, las modificaciones pueden afectar a otras propiedades también.

Concepto: simulación de dinámica molecular (MD)

[0072] Las simulaciones de dinámica molecular (MD) son indicativas de la movilidad de los aminoácidos en una estructura de proteína (véase McCammon, JA and Harvey, SC., (1987), "Dynamics of proteins and nucleic acids", Cambridge University Press). Tales dinámicas de proteína se comparan frecuentemente con los factores B cristalográficos (véase Stout, GH and Jensen, LH, (1989), "X-ray structure determination", Wiley). Mediante la ejecución de la simulación de la MD a, por ejemplo, diferentes temperaturas, se simula la movilidad relacionada con la temperatura de los residuos. Regiones que tienen la máxima movilidad o flexibilidad (aquí fluctuaciones isotrópicas) se pueden sugerir para mutagénesis aleatoria. Se entiende aquí que la alta movilidad encontrada en ciertas áreas de la proteína se puede reducir mediante cambios en estas áreas por sustitución, inserción o eliminación de uno o varios residuos.

[0073] La estructura tetramérica modelada de la asparaginasa de *A. oryzae* se sometió a 2 ns de simulación de dinámica molecular, a temperaturas de 300K, 400K y 500K. Se usó el paquete de simulación molecular GROMACS 3.3 (D. van der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A. E. Mark and H. J. C. Berendsen (2005): GROMACS: Fast, Flexible and Free, J. Comp. Chem. 26 p. 1701-1718). Las simulaciones se configuraron de la siguiente manera:

- 1) La estructura tetramérica modelada se convirtió a topología GROMACS, teniendo cuidado de garantizar que los puentes de disulfuro se definieran correctamente. Se usó el campo de fuerza OPLSAA.
- 2) Se realizaron 100 pasos de minimización de pendientes máximas para eliminar choques de átomo y corregir longitudes de enlace. Véase la figura 4 para archivos de parámetros.
- 3) La estructura se disolvió en una caja de agua de 11 x 11 x 11 nm.
- 4) La estructura disuelta se minimizó en 100 pasos de minimización de pendientes máximas. Véase la figura 4 para archivo de parámetros.
- 5) 2 ns de simulación de MD en NVT se llevaron a cabo a temperaturas 300K, 400K y 500K. Véase la figura 5 para archivo de parámetros.
- 6) Para cada realización se descartaron los primeros 800 ps y la desviación cuadrática media (rmsd) para cada una de las coordenadas del átomo C-alfa se calcularon para los últimos 1.200 ps, usando la herramienta "g-rmsf" del paquete GROMACS.
- 7) Los datos se compararon entre las tres temperaturas de simulación y entre los cuatro monómeros de la estructura (resumidos en la figura 2). Los rangos de residuos que tienen altos valores de rmsd (con respecto al valor medio para esta temperatura) se identifican como regiones móviles y de este modo objetivos de interés para estabilizar mutaciones:

Valor máximo 1: 68 - 74  
 Valor máximo 2: 279 - 288  
 Valor máximo 3: 309 - 319  
 Valor máximo 4: 329 - 342  
 Valor máximo 5: 356 - 363

Concepto: "Felicidad Electroestática"

[0074] La red de carga alrededor de un residuo de aminoácido específico se puede determinar. Es particularmente importante para residuos localizados en la superficie. El concepto "Felicidad Electroestática" pretende reemplazar residuos cargados, que están localizados en un entorno electroestáticamente desfavorable o introducir cargas en posiciones donde el potencial sugiera que tal carga sería electroestáticamente favorable. Condiciones favorables (= residuos felices) son residuos cargados negativamente donde el potencial electroestático es positivo o viceversa; condiciones desfavorables (= residuos infelices) son cuando la carga de residuo tiene el mismo signo que el potencial electroestático. El concepto ha sido descrito en la bibliografía (Jose M. Sanchez-Ruiz and George I. Makhatadze (2001): To charge or not to charge?, TRENDS in Biotechnology 19, pp. 132- 135), pero aquí se implementa utilizando GROMACS:

- 1) La estructura se convierte a topología de GROMACS, usando del campo de fuerza OPLSAA. Este también aplica cargas parciales a cada átomo. Las cargas parciales se promedian sobre los átomos dentro de cada residuo. Este valor será cero para los residuos no valorables.
- 2) El potencial electroestático en cada posición de átomo se computa utilizando la herramienta "genion" de GROMACS. Los potenciales se promedian sobre los átomos dentro de cada residuo.
- 3) Para cada residuo, la "felicidad electroestática" se define como la carga parcial promediada multiplicada por el potencial electroestático promediado. Un valor positivo indica un residuo infeliz, un valor negativo sugiere un residuo feliz. El valor será cero para residuos no valorables.

[0075] Son factibles en algunos casos las inversiones de carga (p. ej. de K a E). En otros casos, la sustitución por un residuo estructuralmente similar pero neutro puede ser óptima. Mutaciones específicas basadas en este concepto son:

residuos que no estén en las interfaces entre los monómeros: R196E, K194E, D88N, E255Q, K290E, E311 K (para los que sugieren una inversión de carga, un residuo neutro puede ser óptimo en cambio). Residuos que están en las interfaces entre los monómeros: D111N, D206N, E235Q, R266L, D275N, E331Q.

5 Concepto: introducción de residuos de prolina

[0076] La sustitución a residuos de prolina se pueden sugerir en varias posiciones basadas en los ángulos de esqueleto  $\phi/\psi$  y choques de cadena lateral. Residuos que se pueden sustituir por prolina se identificaron utilizando el comando SUGPRO del programa WHATIF (G. Vriend (1990): WHAT IF: A molecular modeling and drug design program, J. Mol. Graph. 8, p52- 56). Un método alternativo se describe en la patente nº EP0585285B1.

Concepto: interacciones del punto de simetría

15 [0077] Las asparaginasas tetraméricas tienen 3 ejes de simetría binaria, como se muestra en la figura 3. Como la enzima es un homotetrámero, un residuo localizado a lo largo de uno de estos ejes está en contacto estrecho con el residuo correspondiente en uno de los otros monómeros, y el modelo se repite en el otro extremo del eje de simetría en cuestión.

20 [0078] De esta manera, dos conjuntos de interacciones entre los monómeros se pueden crear mediante sólo una mutación. Esto es especialmente cierto para los puentes de disulfuro, que se pueden introducir por sustitución o inserción de sólo un residuo de cisteína. También otros tipos de interacciones, tales como contactos electroestáticos o hidrofóbicos, se puede introducir a lo largo de los ejes de simetría.

Concepto: recubrimiento de hélice

25 [0079] Los primeros residuos de cada extremo de una hélice alfa de proteína, particularmente en el extremo N-terminal, pueden estar implicados en los enlaces de hidrógeno de cadena lateral de estructura, que son importantes para la estabilidad de la proteína (ref: Protein Science (1998), 7, p21-38). Las sustituciones aquí pueden llevar a un aumento de la termoestabilidad.

30 [0080] En las regiones identificadas utilizando la simulación de dinámica molecular, las siguientes posiciones son particularmente interesantes para la mutación, ya que se pueden aplicar uno o varios de los conceptos anteriormente mencionados:

Valor máximo 1:

|     |                                                     |
|-----|-----------------------------------------------------|
| N70 | (Potencial negativo, posición de prolina razonable) |
| D69 | (Asp infeliz)                                       |
| A72 | (Potencial negativo)                                |

Valor máximo 2:

|      |                           |
|------|---------------------------|
| D279 | (Asp infeliz)             |
| D286 | (Asp infeliz)             |
| K290 | (Lys infeliz)             |
| T280 | (Recubrimiento de hélice) |
| L281 | (Recubrimiento de hélice) |
| N278 | (Potencial negativo)      |
| S283 | (Punto de simetría)       |

Valor máximo 3:

|      |                           |
|------|---------------------------|
| S307 | (Recubrimiento de hélice) |
| E311 | (Glu infeliz)             |
| D312 | (Asp infeliz)             |
| H317 | (Potencial positivo)      |

Valor máximo 4:

|      |               |
|------|---------------|
| E337 | (Glu infeliz) |
|------|---------------|

A336 (Posición de Pro razonable)

Valor máximo 5:

Q361 (Potencial negativo)

K363 (K infeliz, posición de prolina razonable)

#### Métodos para diseñar variantes de asparaginasa nuevas basados en reconstrucción ancestral

- 5 [0081] Una secuencia de asparaginasa ancestral inferida para su uso en un método se puede predecir a partir de las secuencias de un conjunto de proteínas homólogas, como se describe en la bibliografía (Joseph W. Thornton: Resurrecting Ancient Genes: Experimental Analysis Of Extinct Molecules (2004), Nature Reviews Genetics 5, p 366-375; C. W. Cunningham, K. E. Omland & T. H. Oakley: Reconstructing ancestral character states: a critical reappraisal (1998), Trends in Ecology and Evolution 13, p 361-336). Dependiendo del número de secuencias y de su homología, la
- 10 secuencia ancestral inferida puede ser significativamente diferente de cada una de estas secuencias, por ejemplo 40-90%. Por lo tanto, un número importante de los residuos de aminoácidos difieren entre una proteína y su secuencia ancestral inferida.
- 15 [0082] Para obtener una proteína más termoestable, varios residuos de aminoácidos de una proteína se pueden sustituir por los residuos correspondientes de la secuencia ancestral inferida. Debido al gran número de diferencias, se desea un método para seleccionar las posiciones de residuo preferidas para la sustitución. Una forma es identificar regiones, donde la mayor parte de los residuos son iguales en la proteína y en su ancestro predicho. Dentro de esta región, los residuos que difieren entre la proteína y su ancestro se seleccionan para sustitución.
- 20 [0083] Basándose en la reconstrucción ancestral, los presentes inventores han identificado varias variantes de asparaginasa que tienen termoestabilidad aumentada.
- [0084] En un aspecto preferido, un polipéptido de la presente invención comprende al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos en comparación con SEC ID n°: 1, donde cada posición corresponde a una posición en SEC ID n°: 1: V54I, F57L, N70K, I83V, Q84D, L86P, V102D, N260K, T262D, A323R, T327V, A349Q, S351A y/o V353I.
- 25 [0085] En un aspecto incluso más preferido, un polipéptido de la presente invención comprende al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos en comparación con SEC ID n°: 1, donde cada posición corresponde a una posición en SEC ID n°: 1: N70K, A323R, T327V, A349Q, S351A y/o V353I.
- 30 [0086] En un aspecto preferido, el polipéptido es una variante de un polipéptido original. El polipéptido original puede ser cualquier asparaginasa, por ejemplo una de las asparaginasas que tiene las secuencias expuestas en las SEC ID N°: 1-6 u homólogas de las mismas.
- 35 [0087] Polipéptidos de interés particular tienen una combinación de una o más de las diferencias de aminoácidos anteriores con cualquiera de las otras diferencias de aminoácidos descritas en la presente.
- Asparaginasas preferidas
- 40 [0088] Un aspecto de la presente invención se refiere a un polipéptido tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones anexas 6 a 8.
- [0089] El polipéptido puede comprender una sustitución de aminoácidos en comparación con SEC ID n°: 1. Preferiblemente, el polipéptido comprende al menos una de las siguientes sustituciones en comparación con SEC ID n°: 1: 54I, 57L, 70H/K/S, 83V, 84D, 86P, 102D, 137S, 164D, 196I, 201Q, 228V, 260K, 262D, 278H/Q, 283C, 290V, 307A, 312Y, 323R, 327V, 334F, 336C/G/L, 337F/I, 349Q, 351A, 353I, 366P y/o 375T. Incluso más preferiblemente, el polipéptido comprende al menos una, tal como al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o al menos cinco, de las siguientes sustituciones en comparación con SEC ID n°: 1: 70K, 323R, 327V, 349Q, 351A y/o 353I. Incluso más preferiblemente, el polipéptido comprende las siguientes sustituciones en comparación con SEC ID n°: 1: 70K, 323R, 327V, 349Q, 351A y 353I. De la forma más preferible, el polipéptido tiene la misma secuencia que SEC ID n°: 1, o una secuencia homóloga, salvo las siguientes sustituciones: 70K, 323R, 327V, 349Q, 351A y 353I. El polipéptido puede ser una variante de una enzima original que tiene la secuencia de SEC ID n°: 1 o una secuencia homóloga.
- 50 [0090] En un aspecto preferido de la presente invención, el polipéptido comprende una diferencia de aminoácidos en comparación con SEC ID n°: 1 en una posición que corresponde a cualquiera de las posiciones 70, 137, 164, 196, 201, 228, 278, 290, 366 y/o 375 de SEC ID n°: 1. Preferiblemente, el polipéptido comprende al menos una de las siguientes sustituciones: 70H/K/S, 137S, 164D, 196I, 201Q, 228V, 278H/Q, 290V, 366P y/o 375T. El polipéptido puede tener una alta actividad de asparaginasa relativa a alta temperatura, como se ha determinado anteriormente en la sección
- 55

"asparaginasas nuevas". Si el polipéptido es una variante de un polipéptido original, el polipéptido variante puede tener una actividad de asparaginasa relativa más alta a alta temperatura en comparación con el polipéptido original.

[0091] Polipéptidos particularmente preferidos según la presente invención comprenden las siguientes sustituciones o conjuntos de sustituciones en comparación con SEC ID n°: 1: 70H, 70S, 70K, 70K+278H, 70K+278H+196I, 70K+278H+201Q, 70K+283C, 137S, 137S+228V, 164D, 196I, 201 Q, 278H, 278Q, 290V, 366P y/o 366P+375T.

[0092] En otro aspecto preferido de la presente invención, el polipéptido comprende una diferencia de aminoácidos en comparación con SEC ID n°: 1 en al menos una de las siguientes posiciones: 70, 283, 307, 312, 334, 336 y/o 337. Preferiblemente, el polipéptido comprende al menos una de las siguientes sustituciones: 70K, 283C, 307A, 312Y, 334F, 336C/G/L y/o 337F/I, donde cada posición corresponde a una posición de los aminoácidos 1 a 378 de SEC ID n°: 1. El polipéptido puede tener una termoestabilidad alta, como se ha determinado anteriormente en la sección "asparaginasas nuevas". Si el polipéptido es una variante de un polipéptido original, el polipéptido variante puede tener una termoestabilidad más alta en comparación con el polipéptido original.

[0093] Polipéptidos particularmente preferidos según la presente invención comprenden las siguientes sustituciones o conjuntos de sustituciones en comparación con SEC ID n°: 1: 70K, 70K+307A+312Y, 70K+307A+312Y+336L+337F, 70K+307A+312Y+336L+337F+283C, 70K+307A+312Y+334F, 70K+307A+312Y+336G+337I, 70K+307A+312Y+283C, 70K+283C, 70K+336C+337F, 70K+307A y/o 70K+312Y.

[0094] En otro aspecto preferido de la presente invención, el polipéptido comprende al menos una de las siguientes sustituciones: V54I, F57L, N70K, I83V, Q84D, L86P, V102D, N260K, T262D, A323R, T327V, A349Q, S351A y/o V353I en comparación con SEC ID n°: 1. De la forma más preferible, el polipéptido comprende al menos una, tal como al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o al menos cinco, de las siguientes sustituciones: N70K, A323R, T327V, A349Q, S351A y/o V353I en comparación con SEC ID n°: 1. El polipéptido puede tener una alta actividad de asparaginasa relativa a alta temperatura, como se ha determinado anteriormente en la sección "asparaginasas nuevas". Si el polipéptido es una variante de un polipéptido original, el polipéptido variante puede tener una actividad de asparaginasa relativa más alta a alta temperatura en comparación con el polipéptido original.

[0095] Polipéptidos particularmente preferidos según la presente invención comprenden los siguientes conjuntos de sustituciones en comparación con SEC ID n°: 1: N70K+V54I+F57L, N70K+N260K+T262D, N70K+A323R+T327V, N70K+A349Q+S351A+V353I, N70K+183V+Q84D+A323R+T327V, N70K+L86P+V102D+A323R+T327V, N70K+A323R+T327V+A349Q+S351A+V353I, N70K+183V+Q84D+A323R+T327V+A349Q+S351A+V353I, y/o N70K+V102D+A323R+T327V+A349Q+S351A+V353I.

Métodos para preparar variantes de asparaginasa basados en la secuencia

[0096] Las posiciones de los aminoácidos específicos identificadas aquí como importantes para mejorar la termotolerancia de una asparaginasa serán importantes para mejorar la termotolerancia de cualquier asparaginasa cuya secuencia se pueda alinear con SEC ID n°: 1.

[0097] Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención se refiere a un método para preparar un polipéptido que comprende:

- (a) proporcionar una secuencia de aminoácidos de un polipéptido original que tenga actividad de asparaginasa;
- (b) seleccionar al menos un residuo de aminoácido en una posición de la secuencia que corresponda a cualquiera de las posiciones 54, 57, 70, 83, 84, 86, 102, 137, 164, 196, 201, 228, 260, 262, 278, 283, 290, 307, 312, 323, 327, 334, 336, 337, 349, 351, 353, 366 y/o 375 de SEC ID n°: 1;
- (c) modificar la secuencia por sustitución del residuo de aminoácido seleccionado;
- (d) producir un polipéptido variante que tenga la secuencia modificada;
- (e) probar el polipéptido variante para actividad de asparaginasa y termotolerancia; y
- (f) seleccionar un polipéptido variante que tenga actividad de asparaginasa y termotolerancia más alta en comparación con el polipéptido original.

[0098] El polipéptido original tiene preferiblemente una secuencia que tiene al menos 50% de identidad con SEC ID n°: 1, SEC ID n°: 2, SEC ID n°: 3, SEC ID n°: 4, SEC ID n°: 5, SEC ID n°: 6, o un fragmento de cualquiera de estas secuencias, más preferiblemente al menos 60%, al menos 70% o al menos 80% de identidad, e incluso más preferiblemente al menos 90%, al menos 95% o al menos 98% de identidad.

[0099] De la forma más preferible, el polipéptido original tiene una secuencia que comprende o consiste en cualquiera de las SEC ID N°: 1-6 o un fragmento de las mismas. Un fragmento preferido consiste en la secuencia de aminoácidos de la posición que corresponde con la posición 80 de SEC ID n°: 1 en el C-terminal del polipéptido.

[0100] Una termotolerancia más alta en el contexto de la presente invención puede significar una termoestabilidad más alta o una actividad de asparaginasa relativa más alta a alta temperatura.

[0101] La termoestabilidad y la actividad de asparaginasa relativa a alta temperatura se pueden determinar como se ha descrito anteriormente en la sección "asparaginasas nuevas".

[0102] Preferiblemente, la secuencia se modifica por introducción de al menos una de las siguientes sustituciones: 54I, 57L, 70H/K/S, 83V, 84D, 86P, 102D, 137S, 164D, 196I, 201Q, 228V, 260K, 262D, 278H/Q, 283C, 290V, 307A, 312Y, 323R, 327V, 334F, 336C/G/L, 337F/I, 349Q, 351A, 353I, 366P y/o 375T; donde cada posición corresponde a una posición de los aminoácidos 1 a 378 de SEC ID n°: 1.

[0103] En un aspecto más preferido, la secuencia se modifica mediante introducción de al menos una, tal como al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o al menos cinco, de las siguientes sustituciones: 70K, 323R, 327V, 349Q, 351A y/o 353I; donde cada posición corresponde a una posición de los aminoácidos 1 a 378 de SEC ID n°: 1. En un aspecto más preferido, la secuencia se modifica por introducción de las siguientes sustituciones: 70K, 323R, 327V, 349Q, 351A y/o 353I, posiblemente en combinación con otras sustituciones; donde cada posición corresponde a una posición de los aminoácidos 1 a 378 de SEC ID n°: 1.

[0104] La modificación de uno o varios residuos de aminoácidos para obtener un polipéptido de la presente invención se puede realizar mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo como se describe en la WO 94/14963 o WO 94/14964 (Unilever). A continuación se describen métodos para la clonación de secuencias de ADN codificantes de asparaginasa, seguido de métodos para generar mutaciones en sitios específicos en la secuencia codificante de asparaginasa.

#### Clonación de una secuencia de ADN que codifica una asparaginasa

[0105] La secuencia de ADN que codifica una asparaginasa se puede aislar de cualquier célula o microorganismo que produzca la asparaginasa en cuestión, usando varios métodos bien conocidos en la técnica. Primero, un ADN genómico y/o genoteca de ADNc se podría construir utilizando ADN cromosómico o ARN mensajero del organismo que produce la asparaginasa que se va a clonar. Luego, si la secuencia de aminoácidos de la asparaginasa se conoce, sondas de oligonucleótidos marcadas se pueden sintetizar y usar para identificar clones codificantes de asparaginasa a partir de una genoteca genómica obtenida a partir del organismo en cuestión. Alternativamente, una sonda de oligonucleótidos marcada que contiene secuencias homólogas de otro gen de asparaginasa conocido se podría usar como sonda para identificar clones codificantes de asparaginasa, utilizando condiciones de lavado e hibridación de menor astringencia.

[0106] Otro método para identificar clones codificantes de asparaginasa implicaría la inserción de fragmentos de ADNc y/o ADN genómico en un vector de expresión, tal como un plásmido, la transformación de un huésped fúngico o bacteriano negativo para asparaginasa con la genoteca de ADN resultante, y luego la colocación en placas de las células transformadas sobre un medio de agar que permita que los clones expresen la asparaginasa que se va a identificar. Tal medio puede contener, por ejemplo, asparagina como fuente única de nitrógeno, de manera que sólo las células con un gen de asparaginasa activo crecerán. Otro medio puede incluir, por ejemplo, asparagina y un indicador de pH que cambie de color en respuesta al aumento en el pH que se produce cuando es liberado amonio de la asparagina por la asparaginasa.

[0107] Alternativamente, si la secuencia de aminoácidos se conoce para la asparaginasa o asparaginasas relacionadas, se pueden diseñar cebadores de ADN degenerados que permitirán la amplificación directa de la asparaginasa a partir de ADN genómico o de bibliotecas de ADN.

[0108] Alternativamente, las secuencias se pueden determinar para los clones de una genoteca, o para un subconjunto seleccionado de esos clones, y estas secuencias se pueden comparar con las secuencias de asparaginasa conocidas para identificar las secuencias nuevas.

[0109] Alternativamente, la secuencia de ADN que codifica la enzima se puede preparar sintéticamente por métodos estándar establecidos, por ejemplo el método de fosforamidita ha descrito por S.L. Beaucage and M.H. Caruthers, (1981), Tetrahedron Letters 22, p. 1859-1869, o el método descrito por Matthes *et al.*, (1984), EMBO J. 3, pp. 801-805. En el método de fosforamidita, se sintetizan oligonucleótidos, por ejemplo en un sintetizador de ADN automático, se purifican, anillan, ligan y clonan en vectores apropiados.

[0110] Finalmente, la secuencia de ADN puede ser de origen sintético y genómico mezclado, origen de ADNc y sintético mezclado u origen de ADNc y genómico mezclado, preparada por ligamiento de fragmentos de origen sintético, genómico o de ADNc (según sea apropiado, los fragmentos corresponden a varias partes de la secuencia de ADN entera), según técnicas estándar. La secuencia de ADN también se puede preparar por reacción en cadena de polimerasa (PCR) utilizando cebadores específicos, por ejemplo como se describe en la US 4,683,202 o R.K. Saiki *et al.*, (1988), Science 239, pp. 487-491.

#### Construcción de variantes de asparaginasa

[0111] Una variante de asparaginasa se puede obtener por mutagénesis dirigida al sitio en posiciones seleccionadas (véase más adelante) o por mutagénesis aleatoria localizada, es decir, por introducción de residuos de aminoácidos

aleatorios en posiciones seleccionadas o regiones del polipéptido original, por ejemplo como se describe en la WO 95/22615.

[0112] La mutagénesis aleatoria se realiza adecuadamente bien como mutagénesis aleatoria localizada o específica de la región en al menos tres partes del gen que traduce a la secuencia de aminoácidos en cuestión, o dentro del gen entero. Cuando la mutagénesis se realiza por el uso de un oligonucleótido, el oligonucleótido se puede dopar o enriquecer con los tres nucleótidos no originales durante la síntesis del oligonucleótido en las posiciones que se tienen que cambiar. El dopaje o enriquecimiento se puede realizar de manera que se eviten los codones para los aminoácidos indeseados. El oligonucleótido dopado o enriquecido se puede incorporar en el ADN que codifica la enzima de asparaginasa por cualquier técnica, usando, por ejemplo, PCR, LCR o cualquier polimerasa y ligasa de ADN que se considere apropiada.

[0113] Preferiblemente, el dopaje se realiza usando "dopaje aleatorio constante", donde el porcentaje de tipo salvaje y mutación en cada posición está predefinido. Además, el dopaje puede estar dirigido a una preferencia para la introducción de ciertos nucleótidos y, de este modo, a una preferencia para la introducción de uno o varios residuos de aminoácidos específicos. El dopaje se puede hacer, por ejemplo, para permitir la introducción de 90% de tipo salvaje y 10% de mutaciones en cada posición. Una consideración adicional en la elección de un esquema de dopaje se basa en la genética así como en las limitaciones estructurales de las proteínas.

[0114] La mutagénesis aleatoria puede se puede localizar ventajosamente en una parte de la asparaginasa original en cuestión. Esto puede ser ventajoso, por ejemplo, cuando ciertas regiones de la enzima se han identificado por tener importancia particular para una propiedad dada de la enzima.

#### Mutagénesis dirigida al sitio

[0115] Una vez que se ha aislado una secuencia de ADN codificante de asparaginasa y se han identificado sitios deseables para la mutación, se pueden introducir mutaciones utilizando oligonucleótidos sintéticos. Estos oligonucleótidos contienen secuencias de nucleótidos que flanquean los sitios de mutación deseados. En un método específico, un espacio monocatenario de ADN, la secuencia codificante de asparaginasa, se crea en un vector que lleva el gen de asparaginasa. Luego el nucleótido sintético, que lleva la mutación deseada, se anilla a una parte homóloga del ADN monocatenario. El espacio restante se rellena luego con ADN polimerasa I (fragmento Klenow) y el constructo se liga usando el T4 ligasa. Un ejemplo específico de este método se describe en Morinaga *et al.*, (1984), *Biotechnology* 2, pp. 636-639. La US 4,760,025 divulga la introducción de oligonucleótidos que codifican mutaciones múltiples mediante la realización de alteraciones menores del casete. No obstante, una variedad incluso superior de mutaciones se puede introducir en cualquier momento mediante el método de Morinaga, porque una multitud de oligonucleótidos, de longitudes varias, se pueden introducir.

[0116] Otro método para introducir mutaciones en secuencias de ADN codificantes de asparaginasa se describe en Nelson and Long, (1989), *Analytical Biochemistry* 180, pp. 147-151. Implica la generación de 3 pasos de un fragmento de PCR que contiene la mutación deseada introducida usando una cadena de ADN químicamente sintetizada como uno de los cebadores en las reacciones de la PCR. Del fragmento generado por reacción en cadena de polimerasa, un fragmento de ADN que porta la mutación se puede aislar por escisión con endonucleasas de restricción y reinsertar en un plásmido de expresión.

#### Expresión de asparinasas

[0117] Según la invención, una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de la presente invención, incluyendo un variante producida por métodos anteriormente descritos, o por cualquier método alternativo conocido en la técnica, se puede expresar, en forma de enzima, usando un vector de expresión que típicamente puede incluir varias secuencias de control, por ejemplo, un promotor, operador, sitio de unión al ribosoma, señal de iniciación de la traducción, y, en algunos casos, un gen represor o varios genes activadores.

#### Vector de expresión

[0118] El vector de expresión recombinante que porta la secuencia de ADN que codifica una asparaginasa de la invención puede ser cualquier vector que pueda ser sometido convenientemente a procedimientos de ADN recombinante, y la elección del vector frecuentemente dependerá de la célula huésped en la que se introduzca. El vector puede ser uno que, cuando se introduzca en una célula huésped, se integre en el genoma de la célula huésped y se replique junto con el cromosoma(s) en el que se ha integrado.

[0119] En el vector, la secuencia de ADN debería estar operativamente conectada a una secuencia promotora adecuada. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestre actividad transcripcional en la célula huésped de elección y se puede derivar de genes que codifican proteínas bien homólogas o heterólogas de la célula huésped.

[0120] El vector de expresión de la invención también puede comprender un terminador de transcripción adecuado y, en eucariotas, secuencias de poliadenilación operativamente conectadas a la secuencia de ADN que codifica la asparaginasa de la invención. Las secuencias de terminación y poliadenilación pueden derivarse adecuadamente de las mismas fuentes que el promotor.

[0121] El vector puede comprender además una secuencia de ADN que permita que el vector se replique en la célula huésped en cuestión. Ejemplos de tales secuencias son los orígenes de replicación de los plásmidos pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1 y pIJ702.

[0122] El vector también puede comprender una etiqueta seleccionable, por ejemplo un gen cuyo producto complemente un defecto de la célula huésped, tal como los genes *dal* de *B. subtilis* o *B. licheniformis*, o que confiera resistencia antibiótica tal como resistencia a la ampicilina, canamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Además, el vector puede comprender marcadores de selección de *Aspergillus* tal como *amdS*, *argB*, *niaD* y *sC*, un marcador que da origen a la resistencia a la higromicina, o la selección se puede realizar por cotransformación, por ejemplo como se describe en la WO 91/17243.

[0123] Los procedimientos usados para enlazar el constructo de ADN de la invención que codifica una asparaginasa y opcionalmente un promotor, terminador y/u otros elementos, y para insertarlos en vectores adecuados que contengan la información necesaria para replicación, son bien conocidos para personas expertas en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, 1989).

#### Células huésped

[0124] La célula de la invención, que comprende bien un constructo de ADN bien un vector de expresión de la invención tal y como se ha definido anteriormente, se usa de manera ventajosa como célula huésped en la producción recombinante de una asparaginasa de la invención. La célula se puede transformar con el constructo de ADN de la invención que codifica la asparaginasa, convenientemente por integración del constructo de ADN (en una o varias copias) en el cromosoma huésped. Esta integración se considera generalmente como una ventaja ya que la secuencia de ADN es más posible de este modo que se mantenga de forma estable en la célula. La integración de los constructos de ADN en el cromosoma huésped se pueden realizar según métodos convencionales, por ejemplo por recombinación homóloga o heteróloga. Alternativamente, la célula se puede transformar con un vector de expresión como se ha descrito anteriormente en relación con los diferentes tipos de células huésped.

[0125] La célula de la invención puede ser una célula microbiana, por ejemplo una célula bacteriana o un hongo (incluyendo levadura).

[0126] Ejemplos de bacterias adecuadas son bacterias gram positivas tales como *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis*, o *Streptomyces lividans*, o *Streptomyces murinus*, o bacterias gram negativas tales como *E. coli*. La transformación de las bacterias se puede realizar, por ejemplo, por transformación de protoplasto o usando células competentes de manera conocida de por sí.

[0127] El organismo de levadura se puede seleccionar favorablemente de una especie de *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*, por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*.

[0128] La célula huésped también puede ser un hongo filamentoso, por ejemplo una cepa perteneciente a una especie de *Aspergillus*, particularmente *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus niger*, o una cepa de *Fusarium*, tal como una cepa de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense* o *Fusarium venenatum*.

[0129] En una forma de realización particular de la invención, la célula huésped es una cepa deficiente en proteasa o negativa en proteasa.

[0130] Esta puede ser, por ejemplo, la cepa deficiente en proteasa *Aspergillus oryzae* JaL 125 que tiene borrado el gen de proteasa alcalina denominado "alp". Esta cepa se describe en la WO 97/35956 (Novo Nordisk A/S).

[0131] Células de hongos filamentosos se pueden transformar mediante un proceso que implica la formación de protoplasto y la transformación de los protoplastos seguida de regeneración de la pared celular de manera conocida de por sí. El uso de *Aspergillus* como microorganismo huésped se describe en la EP 238 023 (Novo Nordisk A/S), cuyo contenido se incorpora en la presente por referencia.

#### Producción de asparaginasas por cultivo de transformante

[0132] La invención se refiere, entre otras cosas, a un método para producir una asparaginasa de la invención, este método comprende el cultivo de una célula huésped bajo condiciones propicias para la producción de la asparaginasa y recuperación de la enzima a partir de las células y/o el medio de cultivo.

- 5 [0133] El medio usado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para el crecimiento de la célula huésped en cuestión y la obtención de la expresión de la asparaginasa de la invención. Medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según recetas publicadas (p. ej., como se describe en los catálogos de la *American Type Culture Collection*).
- 10 [0134] La asparaginasa segregada a partir de las células huésped puede recuperarse convenientemente del medio de cultivo por procedimientos bien conocidos, incluyendo la separación de las células del medio por centrifugado o filtración, y la precipitación de componentes proteínicos del medio mediante una sal tal como el sulfato de amonio, seguida del uso de procedimientos cromatográficos tales como la cromatografía de intercambio de iones, la cromatografía de afinidad o similares.
- Selección y prueba
- 15 [0135] Variantes de asparaginasa producidas por cualquiera de los métodos descritos en la presente se pueden evaluar, bien antes bien después de la purificación, para actividad de asparaginasa, por ejemplo en un ensayo de selección que mide la capacidad de la variante para hidrolizar asparagina, por ejemplo a alta temperatura.
- 20 [0136] Para llevar a cabo tal selección, un microorganismo transformado con una secuencia de ADN, que codifica una asparaginasa mutada de interés y que tiene la capacidad para expresar ésta, se incuba en un medio adecuado y bajo condiciones adecuadas para la secreción de la enzima.
- 25 [0137] La selección para variantes que tienen termoestabilidad aumentada se puede realizar, por ejemplo, mediante incubación del sobrenadante del cultivo a temperatura elevada (p. ej., en el rango de 50°C-80°C, preferiblemente a 60, 62, 64, 66, 68 y/o 70°C) durante un período de tiempo (p. ej. de 5 a 30 minutos, tal como durante 20 minutos) y medición de la actividad de hidrolización de asparagina a temperatura adecuada, por ejemplo 55°C.
- 30 [0138] La selección para variantes que tienen actividad relativa aumentada a alta temperatura en comparación con, por ejemplo, 37°C se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante la medición de la actividad de hidrolización de asparagina del sobrenadante del cultivo tanto a una temperatura de referencia adecuada (p. ej. 37°C) como a temperatura elevada (p. ej. en el rango de 50°C-80°C, preferiblemente a 60, 62, 64, 66, 68 y/o 70°C). La actividad relativa se determina como la actividad de hidrolización de asparagina a temperatura elevada dividida por la actividad a la temperatura de referencia.
- 35 [0139] La medición de la actividad de hidrolización de asparagina se puede realizar por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo como se describe en los ejemplos.
- 40 [0140] Los clones que codifican las variantes de asparaginasa que tienen termoestabilidad más alta y/o actividad relativa más alta a alta temperatura se pueden seleccionar para la confirmación de la secuencia y la purificación enzimática. Se pueden realizar más pruebas relacionadas con otras propiedades alteradas en variantes purificadas conforme a los métodos conocidos en la técnica. Tales propiedades alteradas incluyen termoestabilidad, actividad dependiente de la temperatura, termoinactivación, actividad dependiente del pH, estabilidad dependiente del pH, actividad específica o especificidad de sustrato y cualquier otro parámetro de interés.
- 45 Producción de alimentos
- 50 [0141] Las asparaginasas según la presente invención pueden ser adecuadas para la producción de productos alimenticios, tales como alimentos que contienen carbohidratos térmicamente procesados. Tales productos alimenticios, incluyendo café, cereales, galletas, patatas chips, galletas saladas, patatas fritas, panes y bollos, se ha mostrado en muchos casos que contienen acrilamida, que se considera que probablemente sea cancerígeno para animales y seres humanos. La acrilamida se puede formar cuando la asparagina del aminoácido se calienta en presencia de un azúcar reductor. Por lo tanto, la reducción de acrilamida en alimentos procesados térmicamente se pueden conseguir añadiendo una asparaginasa de la presente invención a un material alimenticio antes del calentamiento.
- 55 [0142] Un material alimenticio en el contexto de la presente invención se refiere a cualquier forma no procesada o parcialmente procesada del producto alimenticio que se produzca durante el proceso de producción antes de obtener la forma final del producto alimenticio.
- 60 [0143] Un aspecto de la presente invención es por lo tanto un método para la reducción de acrilamida en un producto alimenticio, donde una asparaginasa de la invención se añade a un material alimenticio que posteriormente se calienta. La enzima debería añadirse en una cantidad que sea efectiva para la reducción del nivel de asparagina presente en el material alimenticio que se va a calentar.
- 65 [0144] Ejemplos de productos alimenticios donde el proceso según la invención puede ser útil incluyen cualquier producto a base de cereales, tal como pan, repostería, pasteles, galletas saladas, bagels, galletas, pan de jengibre,

pastel de jengibre, cereales para el desayuno y pan tostado; cualquier producto a base de patata, tal como patatas fritas o chips de patata, snacks de patata preparados y croquetas; y cualquier producto a base de café.

[0145] Los pasos de calentamiento preferidos son aquellos en los que al menos una parte del material alimenticio, por ejemplo la superficie del material alimenticio, se expone a temperaturas en las que la formación de acrilamida se promueve, por ejemplo 110°C o más o 120°C o más. El paso de calentamiento del proceso según la invención se puede realizar en hornos, por ejemplo a una temperatura entre 180-220°C, tal como para la cocción de pan y otros productos de panadería, o en aceite como la fritura de patatas fritas, por ejemplo a 160-190°C.

[0146] Una forma de realización preferida es un método para reducir la acrilamida en las patatas fritas u otros productos alimenticios a base de vegetales fritos. El material alimento vegetal, por ejemplo patatas, puede entrar en contacto con una asparaginasa según la invención después o durante el blanqueo, antes del secado y la prefritura, para producir un material alimenticio vegetal precocinado. La enzima también se puede adicionar después de la prefritura. El material alimenticio vegetal precocinado se somete preferiblemente a una fritura final para producir un producto alimenticio vegetal frito, o se congela para producir un material alimenticio vegetal precocinado congelado, que, por ejemplo, después de almacenamiento en congelador se puede someter a una fritura final para producir un producto alimenticio vegetal frito, por ejemplo patatas fritas. El contacto con la asparaginasa de la presente invención se realiza preferiblemente por inmersión, remojo o recubrimiento del material alimenticio vegetal en una solución enzimática acuosa o una mezcla que contiene dicha enzima.

#### Ejemplos:

##### Materiales y métodos:

##### Cepas y plásmidos

[0147] *E. coli* DH12S (disponible de Gibco BRL) se usó para rescatar plásmido de levadura.

[0148] pJN001 N2 es un vector transportador de *S. cerevisiae* y *E. coli* bajo el control del promotor TPI, construido a partir de pJC039 descrito en la WO 01/92502, donde el gen de asparaginasa de *Aspergillus oryzae* se ha insertado.

[0149] YNG318 de *Saccharomyces cerevisiae*: MATa Dpep4[cir+] ura3-52, leu2-D2, his 4-539 se usó para la expresión de variantes de asparaginasa. Se describe en J. Biol. Chem. 272 (15), págs 9720-9727, 1997.

##### Medios y sustratos

[0150] 10X solución basal: base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (Difco) 66,8 g/l, succinato 100 g/l, NaOH 60 g/l.

[0151] Glucosa SC: 20% de glucosa (es decir, una concentración final de 2% = 2 g/100ml) 100 ml/l, 5% de treonina 4 ml/l, 1% de triptófano 10 ml/l, 20% de ácidos de casamino 25 ml/l, 10 X solución basal 100 ml/l. La solución se esteriliza utilizando un filtro de un tamaño de poro de 0,20 micrómetros. Agar y H<sub>2</sub>O (aprox. 761 ml) se someten a autoclave juntos y la solución de glucosa SC esterilizada por separado se añade a la solución de agar.

[0152] YPD: bacto-peptona 20 g/l, extracto de levadura 10 g/l, 20% de glucosa 100 ml/l.

[0153] Solución PEG/LiAc: 40% de PEG4000 50ml, 5M de acetato de litio 1ml

##### Manipulaciones de ADN

[0154] A menos que se especifique lo contrario, las manipulaciones y transformaciones de ADN se realizaron utilizando métodos estándar de biología molecular como se describe en Sambrook *et al.* (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor lab. Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, F. M. *et al.* (eds.) "Current protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, 1995; Harwood, C. R. and Cutting, S. M. (eds.).

##### Transformación de levadura

[0155] La transformación de levadura se efectuó por el método de acetato de litio. Mezclar 0,5 microL de vector (digerido por endonucleasas de restricción) y 1 microL de fragmentos de la PCR. Descongelar células competentes YNG318 en hielo. Mezclar 100 microL de las células, la mezcla de ADN y 10 microL de ADN portador (Clontech) en tubos de polipropileno de 12ml (Falcon 2059). Añadir 0,6ml de solución PEG/LiAc y mezclar suavemente. Incubar durante 30 min a 30°C y 200 r.p.m. Incubar durante 30 min a 42°C (golpe de calor). Transferir a un tubo Eppendorf y centrifugador durante 5 seg. Eliminar el sobrenadante y volver a disolver en 3ml de YPD. Incubar la suspensión celular durante 45min a 200rpm a 30°C. Verter la suspensión en placas de glucosa SC e incubar 30°C durante 3 días para hacer colonias. Se extrajo el ADN total de levadura por el método de Robzyk y Kassir descrito en *Nucleic acids research* vol.20, No.14 (1992) 3790.

## Secuenciación del ADN

[0156] La transformación de *E. coli* para secuenciación del ADN se efectuó por electroporación (BIO-RAD Gene Pulser). Se prepararon plásmidos de ADN por el método alcalino (clonación molecular, Cold Spring Harbor) o con el kit de plásmidos de Qiagen®. Fragmentos de ADN se recuperaron a partir de gel de agarosa por el equipo de extracción de gel Qiagen. PCR se llevó a cabo utilizando un motor de ADN PTC-200. El analizador genético ABI PRISM™ 310 se usó para determinar todas las secuencias de ADN.

**Ejemplo 1: construcción de vector de expresión de asparaginasa**

[0157] El gen de asparaginasa de *Aspergillus oryzae* (SEC ID n°: 1) se amplificó con el par de cebadores Cutipre-asparaN2 F (SEC ID n°: 7) y AsparaC R (SEC ID n°: 8). Los fragmentos de la PCR resultantes se introdujeron en YNG318 de *S. Cerevisiae* junto con el vector digerido pJC039 con enzimas de restricción para eliminar la parte madura del gen de cutinasa de *Humicola insolens*. Cutipre-asparaN2 (41 meros)

AGCCTTGTTGCTGCTCTCCCCGCCACAGACTCGAACGTCAC

AsparaC R (50 meros)

AGTACCCTCTAGATCTCGACTTAATTAATCAAGCAACCCCAATCCGCTC

[0158] El plásmido, denominado pJN001 N2, se recuperó de los transformantes de levadura en las placas de glucosa SC y la secuencia interna se determinó para confirmar el gen de asparaginasa. pJN001 N2 así tiene la secuencia de señal de cutinasa de *Humicola insolens* (MKFFTTILSTASLVAALP) seguida de la secuencia de la parte madura de asparaginasa de *Aspergillus oryzae* (aminoácidos 27-378 de SEC ID n°: 1).

**Ejemplo 2: construcción de bibliotecas de levadura y variantes dirigidas al sitio**

[0159] Se construyeron bibliotecas en levadura y variantes dirigidas al sitio por el método de SOE-PCR (empalme por extensión de superposición, véase "PCR: A practical approach", p. 207-209, Oxford University press, eds. Mcferson, Quirke, Taylor), seguido de introducción de los fragmentos de la PCR purificados mezclados con digestión de vector en el *Saccharomyces cerevisiae* para recombinación *in vivo*.

**Ejemplo 3: selección de biblioteca (selección de actividad relativa)**

[0160] Se prepararon clones/bibliotecas de levadura como en el ejemplo 2, usando pJN001 N2 como estructura. Se inocularon clones en glucosa SC en un pocillo de una placa de microtítulos de 96 pocillos que contenía medio YPD y se cultivaron a 28°C durante 3 días. Para determinar la actividad relativa a una temperatura elevada determinada en comparación con una temperatura de referencia (37°C), la actividad de hidrolización de asparagina del sobrenadante del cultivo se midió tanto a 37°C como a la temperatura más alta (63°C o 65°C). La actividad relativa se determinó como la actividad de hidrolización de asparagina a temperatura elevada dividida por la actividad a 37°C. Los clones con actividad relativa más alta se seleccionaron y las secuencias se confirmaron.

Reactivos:

[0161]

- 1M de tampón de fosfato potásico (pH 6.0)  
1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (136g/500ml) + 1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (174g/500ml)  
Ajuste a pH 6.0
- 100mM tampón de fosfato potásico (pH 6,0) + 0,1% tritonX-100 (1L)  
100ml 1M tampón de fosfato potásico (pH 6,0)  
1g Tritón X-100  
Ajuste a 1000ml
- 2 M solución de hidroxilamina (HA) (100ml)  
13,9 g de hidroxilamina  
Ajuste a 100ml con 100mM de tampón de fosfato potásico (pH 6)
- Solución de parada (500ml)  
23,83 ml acetato  
13,88 g FeCl<sub>3</sub> 6 H<sub>2</sub>O  
84 ml 5N HCl  
Ajuste 500 ml con H<sub>2</sub>O
- Solución de sustrato (100ml)  
10 ml 1M tampón de fosfato potásico  
0,5 g L-asparaguina (132,12, concentración final 0,0325M)  
5 ml 2M solución HA  
Ajuste a 100 ml con H<sub>2</sub>O.

Ensayo:

[0162]

- 1 Pipeta 20 microL muestra en un pocillo.
- 2 Añadir 100 microL de solución de sustrato en el pocillo.
- 3 Incubar 20 minutos a 37°C y más temperatura.
- 4 Añadir 100 microL de solución de parada en el pocillo.
- 5 Medir A490 y determinar la actividad relativa a 37°C.

Resultados:

[0163]

Tabla 1. Clon JN001 N2 sostiene JN001 N2 que codifica asparaginasa de *Aspergillus oryzae* de tipo salvaje. En los otros clones, la asparaginasa codificada tiene las sustituciones de aminoácidos indicadas.

| #Clon   | Sustitución      | Actividad relativa |           |
|---------|------------------|--------------------|-----------|
|         |                  | 63°C/37°C          | 65°C/37°C |
| JN002N2 | N70K             | 732%               | 661%      |
| JN003N2 | A137S            | 146%               | 125%      |
| JN007N2 | N278H            | 127%               | 107%      |
| JN009N2 | E366P            | 131%               | 108%      |
| JN010N2 | N70K+N278H       | 635%               | 557%      |
| JN011N2 | N70K+N278H+R196I | 682%               | 582%      |
| JN012N2 | N70K+N278H+L201Q | 325%               | 284%      |
| JN018N2 | N70K+S283C       | 350%               | 271%      |
| JN001N2 | tipo salvaje     | 124%               | 105%      |

**Ejemplo 4: selección de biblioteca (selección de estabilidad)**

[0164] Clones/bibliotecas de levadura se prepararon como en el ejemplo 2, usando pJN001 N2 como estructura. Se inocularon clones en la glucosa SC a un pocillo de una placa de microtítulo de 96 pocillos que contenía medio YPD y se cultivaron a 28°C durante 3 días. Para determinar la actividad restante después del tratamiento térmico, la actividad de hidrólisis de asparagina del sobrenadante del cultivo se midió a 55°C después de la incubación durante 20 minutos a temperatura elevada (64°C o 66°C, 4°C como referencia). Luego los clones con actividad restante más alta se seleccionaron y la secuencia se confirmó.

Reactivos:

[0165]

- 1 M tampón de fosfato potásico (pH 6,0)  
1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (136g/500ml) + 1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (174g/500ml)  
Ajuste a pH 6,0
- 100 mM tampón de fosfato potásico (pH 6,0) + 0,1% tritonX-100 (1L)  
100 ml 1 M tampón de fosfato potásico (pH 6,0)  
1g Tritón X-100  
Ajuste a 1.000 ml
- 2 M solución de hidroxilamina (HA) (100ml)  
13,9 g hidroxilamina  
Ajuste a 100 ml con 100 mM tampón de fosfato potásico (pH 6)
- Solución de parada (500ml)  
23,83 ml acetato  
13,88 g FeCl<sub>3</sub> 6 H<sub>2</sub>O  
84 ml 5N HCl  
Ajuste a 500ml con H<sub>2</sub>O
- Solución de sustrato (100 ml)  
10 ml 1 M tampón de fosfato potásico  
0,5 g L-asparaguina (132,12, concentración final 0,0325 M)  
5 ml 2 M solución de HA  
Ajuste a 100 ml con H<sub>2</sub>O

Ensayo:

[0166]

- 5 1 Pipeta 20 microL muestra en un pocillo.
- 2 Incubar la placa de 96 pocillos a temperatura apropiada durante 20 min. (4°C para un control)
- 3 Añadir 100 microL de solución de sustrato en el pocillo.
- 4 Incubar 20 min. a 55°C.
- 10 5 Añadir 100 microL de solución de parada en el pocillo.
- 6 Medir A490.

Resultados:

[0167]

15

Tabla 2. Clon JN001 N2 sostiene pJN001 N2 que codifica asparaginasa de *Aspergillus oryzae* de tipo salvaje. En los otros clones, la asparaginasa codificada tiene las sustituciones de aminoácidos indicadas.

|         | 4°C 20 min<br>(referencia) | 64°C 20min | 66°C 20min |                                    |
|---------|----------------------------|------------|------------|------------------------------------|
| JN001N2 | 100%                       | 34%        | 4%         | tipo salvaje                       |
| JN002N2 | 100%                       | 50%        | 4%         | N70K                               |
| JN055N2 | 100%                       | 68%        | 8%         | N70K+S307A+D312Y                   |
| JN056N2 | 100%                       | 85%        | 32%        | N70K+S307A+D312Y+A336L+E337F       |
| JN057N2 | 100%                       | 85%        | 69%        | N70K+S307A+D312Y+A336L+E337F+S283C |
| JN030N2 | 100%                       | 71%        | 10%        | N70K+S307A+D312Y+S334F             |
| JN031N2 | 100%                       | 85%        | 35%        | N70K+S307A+D312Y+A336G+E337I       |
| JN032N2 | 100%                       | 81%        | 52%        | N70K+S307A+D312Y+S283C             |
| JN018N2 | 100%                       | 69%        | 12%        | N70K+S283C                         |
| JN024N2 | 100%                       | 86%        | 66%        | N70K+A336C+E337F                   |
| JN025N2 | 100%                       | 65%        | 11%        | N70K+S307A                         |
| JN029N2 | 100%                       | 93%        | 72%        | N70K+D312Y                         |

20

#### Ejemplo 5: bibliotecas de saturación y prueba para actividad relativa

[0168] Se prepararon bibliotecas de saturación como en el ejemplo 2. La estructura fue JN001, que tiene una mutación adicional K226R en comparación con JN001 N2. Se construyeron clones en la glucosa SC como se describe en el ejemplo 2. Se llevó a cabo la selección para actividad relativa aumentada como se describe en el ejemplo 3. La tabla muestra variantes que actuaron mejor que JN001.

25

Tabla 3. Clon JN001 N2 sostiene pJN001 N2 que codifica asparaginasa de *Aspergillus oryzae* de tipo salvaje. En los otros clones, la asparaginasa codificada tiene las sustituciones de aminoácidos indicadas.

30

| nombre de clon | sustitución           | 65°C/37°C |
|----------------|-----------------------|-----------|
| 2              | N70H + K226R          | 215%      |
| 3              | N70S + K226R          | 117%      |
| 4              | N70K + K226R          | 302%      |
| 37             | A137S + K226R + I228V | 65%       |
| 42             | V164D + K226R         | 96%       |
| 52             | R196I + K226R         | 39%       |
| 56             | L201Q + K226R         | 32%       |
| 88             | K226R + N278H         | 51%       |
| 90             | K226R + N278Q         | 32%       |
| 103            | K226R + K290V         | 45%       |

|         |                       |      |
|---------|-----------------------|------|
| 131     | K226R + E366P + I375T | 39%  |
| JN001   | K226R                 | 15%  |
| JN001N2 | tipo salvaje          | 122% |

**Ejemplo 6: construcción de variantes dirigidas al sitio basadas en alineamiento de secuencia ancestral**

- 5 [0169] Las 90 secuencias de asparaginasa recuperadas de la tabla 4 inferior se alinearon con CLUSTAL X (Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic. Acids Res. 25, 4876-82.) utilizando los ajustes por defecto. El alineamiento se ajustó ligeramente de forma manual.

10 Tabla 4: Secuencias de asparaginasa recuperadas

| Nº sec. Uniprot | Longitud de secuencia | Organismo                                         |
|-----------------|-----------------------|---------------------------------------------------|
| o25424          | 330                   | <i>Helicobacter pylori (Campylobacter pylori)</i> |
| o34482          | 375                   | <i>Bacillus subtilis</i>                          |
| o68897          | 362                   | <i>Pseudomonas fluorescens</i>                    |
| p00805          | 348                   | <i>Escherichia coli</i>                           |
| p06608          | 348                   | <i>Erwinia chrysanthemi</i>                       |
| p10172          | 331                   | <i>Acinetobacter glutaminasificans</i>            |
| p10182          | 337                   | <i>Pseudomonas especie</i>                        |
| p11163          | 362                   | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>                   |
| p38986          | 381                   | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>                   |
| p43843          | 349                   | <i>Haemophilus influenzae</i>                     |
| p50286          | 330                   | <i>Wolinella succinogenes</i>                     |
| p87015          | 360                   | <i>Schizosaccharomyces pombe</i>                  |
| q0bep8          | 340                   | <i>Burkholderia cepacia</i>                       |
| q0cwj1          | 375                   | <i>Aspergillus terreus</i>                        |
| q0kyf3          | 352                   | <i>Shewanella baltica</i>                         |
| q0pc96          | 331                   | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                     |
| q0t0t1          | 348                   | <i>Shigella flexneri</i>                          |
| q0tdp4          | 348                   | <i>Escherichia coli</i>                           |
| q0z1e7          | 397                   | <i>Acidovorax especie</i>                         |
| q13zi0          | 346                   | <i>Burkholderia xenovorans</i>                    |
| q17xa3          | 350                   | <i>Helicobacter acinonychis str. Sheeba</i>       |
| q1ca77          | 345                   | <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>                |
| q1cgg1          | 345                   | <i>Yersinia pestis</i>                            |
| q1cte7          | 332                   | <i>Bordetella avium</i>                           |
| q1ic27          | 362                   | <i>Pseudomonas</i>                                |
| q1llw7          | 333                   | <i>Ralstonia metallidurans</i>                    |
| q1r770          | 348                   | <i>Escherichia coli</i>                           |
| q1vd62          | 354                   | <i>Vibrio alginolyticus</i>                       |
| q1yz44          | 354                   | <i>Photobacterium profundum</i>                   |
| q1zuu5          | 355                   | <i>Vibrio angustum</i>                            |
| q2bxx2          | 355                   | <i>Photobacterium especie</i>                     |
| q2l2r3          | 335                   | <i>Bordetella avium</i>                           |
| q2uri4          | 378                   | <i>Aspergillus oryzae</i>                         |
| q2wm94          | 336                   | <i>Clostridium beijerincki</i>                    |

|        |     |                                                                |
|--------|-----|----------------------------------------------------------------|
| q2xme2 | 362 | <i>Pseudomonas putida</i>                                      |
| q31wl9 | 348 | <i>Shigella boydii</i>                                         |
| q32c26 | 348 | <i>Shigella dysenteriae</i>                                    |
| q39fj0 | 340 | <i>Burkholderia especie (cepa 383) (Burkholderia cepacia)</i>  |
| q3egb1 | 349 | <i>Actinobacillus succinogenes</i>                             |
| q3kez6 | 362 | <i>Pseudomonas fluorescens</i>                                 |
| q3nva7 | 316 | <i>Shewanella frigidimarina</i>                                |
| q3q5w2 | 385 | <i>Shewanella baltica</i>                                      |
| q3yxe4 | 348 | <i>Shigella sonnei</i>                                         |
| q4bpb5 | 340 | <i>Burkholderia vietnamiensis</i>                              |
| q4heg6 | 331 | <i>Campylobacter coli</i>                                      |
| q4hj04 | 348 | <i>Campylobacter lari</i>                                      |
| q4hpf7 | 346 | <i>Campylobacter upsaliensis</i>                               |
| q4hwj9 | 371 | <i>Gibberella zeae (Fusarium graminearum)</i>                  |
| q4iwh0 | 362 | <i>Azotobacter vinelandii</i>                                  |
| q4kex6 | 362 | <i>Pseudomonas fluorescens</i>                                 |
| q4wke2 | 379 | <i>Aspergillus fumigatus</i>                                   |
| q57im4 | 347 | <i>Salmonella choleraesuis</i>                                 |
| q57k10 | 348 | <i>Salmonella choleraesuis</i>                                 |
| q5bgn0 | 378 | <i>Emmericella nidulans (Aspergillus nidulans).</i>            |
| q5hxc9 | 331 | <i>Campylobacter jejuni</i>                                    |
| q5l874 | 352 | <i>Bacteroides fragilis</i>                                    |
| q5nlv3 | 366 | <i>Zymomonas mobilis</i>                                       |
| q5p3f1 | 361 | <i>Azoarcus especie</i>                                        |
| q5pmk6 | 348 | <i>Salmonella paratyphi</i>                                    |
| q63il0 | 351 | <i>Burkholderia pseudomallei (Pseudomonas pseudomallei)</i>    |
| q64nh4 | 352 | <i>Bacteroides fragilis</i>                                    |
| q65qv3 | 355 | <i>Mannheimia succiniciproducens</i>                           |
| q6bj17 | 396 | <i>Debaryomyces hansenii (levadura) (Torulaspora hansenii)</i> |
| q6bxt9 | 331 | <i>Debaryomyces hansenii (levadura) (Torulaspora hansenii)</i> |
| q6czm5 | 349 | <i>Erwinia carotovora subesp. atroseptica</i>                  |
| q6fal6 | 355 | <i>Acinetobacter especie</i>                                   |
| q6li34 | 354 | <i>Photobacterium profundum</i>                                |
| q6q4f3 | 348 | <i>Erwinia chrysanthemi</i>                                    |
| q6q4f4 | 346 | <i>Erwinia carotovora</i>                                      |
| q74z49 | 388 | <i>Ashbya gossypii (levadura) (Eremothecium gossypii).</i>     |
| q7chj3 | 345 | <i>Yersinia pestis</i>                                         |
| q7wwk9 | 349 | <i>Erwinia carotovora</i>                                      |
| q83q85 | 348 | <i>Shigella flexneri</i>                                       |
| q87j79 | 354 | <i>Vibrio parahaemolyticus</i>                                 |
| q88k39 | 362 | <i>Pseudomonas putida</i>                                      |
| q89kf7 | 379 | <i>Bradyrhizobium japonicum</i>                                |
| q8a446 | 352 | <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>                            |
| q8cvr4 | 348 | <i>Escherichia coli</i>                                        |
| q8nkc0 | 360 | <i>Schizosaccharomyces pombe</i>                               |
| q8tff8 | 356 | <i>Schizosaccharomyces pombe</i>                               |
| q8xcu2 | 348 | <i>Escherichia coli</i>                                        |
| q8xgy3 | 348 | <i>Salmonella typhi</i>                                        |

|        |     |                                  |
|--------|-----|----------------------------------|
| q8zld3 | 347 | <i>Salmonella typhimurium</i>    |
| q9i407 | 362 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>    |
| q9uts7 | 356 | <i>Schizosaccharomyces pombe</i> |
| q9zlb9 | 332 | <i>Helicobacter pylori</i>       |
| p3jrh9 | 396 | <i>Burkholderia pseudomallei</i> |

[0170] Se construyó el árbol filogenético de asparaginasa por el método de unión de vecinos. (Saitou, N.& Nei, M. (1987) . The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4, 406-425). Se seleccionaron dieciocho secuencias de asparaginasa (tabla 5) para la construcción de un árbol filogenético. Estas secuencias se seleccionaron eliminando las secuencias con bajas homologías y evitando repetición para cubrir la diversidad más amplia posible.

Tabla 5. Asparaginastas microbianas seleccionados para reconstrucción

| Nº Uniprot | sec. | Organismo                                           | Enzima                                                                                                                 |
|------------|------|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| p10182     |      | Especie <i>Pseudomonas</i>                          | ASPQ_PSES7. Glutaminasa-asparaginasa (EC 3.5.1.38) (L-asparagina/L-glutaminaamidohidrolasa) (L-ASNasa/L-GLNasa) (PGA). |
| q5p3f1     |      | Especie <i>Azoarcus</i>                             | Q5P3F1_AZOSE. L-asparagina amidohidrolasa (EC 3.5.1.1).                                                                |
| q6q4f4     |      | <i>Erwinia c carotovora subespecie atroseptica</i>  | Q6Q4F4_ERWCH. Precursor de L-asparaginasa.                                                                             |
| q8zld3     |      | <i>Salmonella typhimurium</i>                       | Q8ZLD3_SALTY. Putativa L-asparaginase (EC 3.5.1.1) (EC 1.6.4.2).                                                       |
| q6czm5     |      | <i>Erwinia carotovora subespecie atroseptica</i>    | Q6CZM5_ERWCT. L-asparaginasa II (EC 3.5.1.1).                                                                          |
| q9uts7     |      | <i>Schizosaccharomyces pombe</i>                    | ASPG2_SCHPO. Probable precursor de L-asparaginasa 2 (EC 3.5.1.1) (L- asparagina amidohidrolasa 2).                     |
| q4wke2     |      | <i>Aspergillus fumigatus</i>                        | Q4WKE2_ASPFU. L-asparaginasa.                                                                                          |
| q2uri4     |      | <i>Aspergillus oryzae</i>                           | Q2URI4_ASPOR. Asparaginasa.                                                                                            |
| q5bgn0     |      | <i>Emericella nidulans (Aspergillus nidulans)</i> . | Q5BGN0_EMENI. Proteína hipotética.                                                                                     |
| q4iwh0     |      | <i>Azotobacter vinelandii</i>                       | Q4IWH0_AZOVI. L-asparaginasa, precursor tipo II (EC 3.5.1.38).                                                         |
| q4heg6     |      | <i>Campylobacter coli</i>                           | Q4HEG6_CAMCO. L-asparaginasa II (EC 3.5.1.1).                                                                          |
| q7vie4     |      | <i>Helicobacter hepaticus</i>                       | Q7VIE4_HELHP. L-asparaginasa (EC 3.5.1.1).                                                                             |
| q8a446     |      | <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>                 | Q8A446_BACTN. L-asparaginasa II.                                                                                       |
| q1yz44     |      | <i>Photobacterium profundum</i>                     | Q1YZ44_PHOPR. Putativa periplásmica L-asparaginase II.                                                                 |
| q3q5w2     |      | <i>Shewanella baltica</i>                           | Q3Q5W2_9GAMM. L-asparaginasa, tipo II (EC 3.5.1.1).                                                                    |
| q0tdp4     |      | <i>Escherichia coli</i>                             | Q0TDP4_ECOL5. L-asparaginasa II (EC 3.5.1.1).                                                                          |
| p43843     |      | <i>Haemophilus influenzae</i>                       | ASPG2_HAEIN. Probable percusor periplásmico de L-asparaginasa (EC 3.5.1.1) (L-asparagina amidohidrolasa) (L-ASNasa).   |
| q3egb1     |      | <i>Actinobacillus succinoqenes</i>                  | Q3EGB1_ACTSC. Precursor de asparaginasa (EC 3.5.1.1).                                                                  |

[0171] Después de seleccionar regiones bien alineadas con GBLOCKS (Castresana, J. (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. Mol. Biol. Evol. 17, 540-52), el árbol de puzzle de cuarteto se infirió con Tree-Puzzle 5.0 (Schmidt, H. A., Strimmer, K., Vingron, M. & von Haeseler, A. (2002). TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. Bioinformatics 18, 502-4). El árbol de probabilidad máxima se buscó luego con el CODEML en el paquete de programa PAML 3.13 (Yang, Z. (1997). PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. Comput. Appl. Biosci. 13, 555-6) con la opción de búsqueda de árbol automática utilizando árbol de puzzle de cuarteto como árbol inicial. Los residuos ancestrales se infirieron luego con CODEML en PAML con la opción de árbol de usuario, donde se usó la topología del árbol de probabilidad máxima (figura 6). Luego, el nodo 19 y 20 se usaron como secuencias ancestrales inferidas por el método de probabilidad máxima. También se usó el método de parsimonia con el software Bogen (Bogenpheil Co. Ltd.) para inferir secuencias ancestrales a los nodos nodo19 y nodo20 del árbol. Estas secuencias se muestran como V19 y V20 más adelante.

[0172] Las secuencias ancestrales inferidas:

**nodo19 (SEC ID nº: 9)**

PNIVILATGGTIAGAAASATVDTLIEAVPELKDLANVKGEQVANIGSEDMNNEILLKLGIVITHGT  
DTLEETAYFLNLTVKSDKPVVLVGAMRPATAISADGPMNLNAVAVAADKEARGKGVLLVM  
NDRIGSARYVTKTNTTTVDFAKAPGYLGIVVNGKVYFFTRPHTTNSEFDVRKIDSLPKVDILYS  
YQNAAIDNGAKGIVYAGTGNGSVSKRAKAGLKKAGIVVVRSSRVGNLNPQKARILLMLALT  
QT

**nodo20 (SEC ID nº: 10)**

PNIVILATGGTIAGAGASATVDTLIEAVPELKDLANVKGEQVANIGSEDMNNEILLKLGIVITHGT  
DTLEETAYFLNLTVKSDKPVVLVGAMRPATAISADGPMNLNAVAVAADKESRGKGVLLVM  
NDRIQSARYVTKTNTTNVDFAKSPGPLGYIVVNGKVYFFRSPHTTNSEFDVRKIDSLPKVDILY  
SYANALIDNGAKGIVHAGTGNGSISKRLKDALKKAGIVVVRSSRVGQGLNPQKARILLMLALT  
QT

**>V19 (SEC ID nº: 11)**

MLALLSAAPALPNITILATGGTIAGAAASATQTTGYTAGAVGVDTLIAAVPELKDLANVAGEQV  
ANIDSEEDITNAILLKLAKRVNALLADPDVDGIVITHGTDTLEETAYFLNLTLSAKPVVLVGAMR  
PATALSADGPLNLNAVAVAADKAARGKGVLVAMNDRIGSARFVTKANTTDLDAFKAPEQG  
  
NLGAIANGKVYFFTSPAKRHTLDSEFDRAIDSLPKVDILYDYQDADADAYDAAIDNGAKGIVIA  
GSGNGSVSKRAKAAKAAKEGIIIVRSSRVGNGVVLDAADDAGVAAGSLNPQKARILLMLA  
LTKTKDPEEIQRYFDQY

**>V20 (SEC ID nº: 12)**

MLLLAAPALPNITILATGGTIAGAGASATDTTGYTAGKVGVDTLIAAVPELKDLANVAGEQVAN  
IDSEEDITNEILLKLAKRVNALLDDPDVDGIVITHGTDTLEETAYFLNLTLSKDKPVVLVGAMRPA  
TALSADGPLNLNAVAVAADKAARGKGVLVAMNDRIGSARDVAKANTTDLDAFKSPFGPLG  
AIANGKVYFFRSPAKRHTLDSEFDVRAIDSLPKVDILYSYANADADAYKALADNGAKGIVHAG  
SGNGSVSKRAKAAKAAKEGIIIVRSSRVNNGVVLDAADDAKLGAAGDLNPQKARILLMLA  
LTKTKDPKEIQRYFDEY

- 5 [0173] Las posiciones para mutagénesis dirigida al sitio se seleccionaron mediante la alineación de estas secuencias ancestrales inferidas con la secuencia de asparaginasa objetivo (asparaginasa de *Aspergillus oryzae*). Luego se construyeron variantes dirigidas al sitio en la estructura JN002N2 como se describe en el ejemplo 3.

Tabla 6. Las variantes dirigidas ancestrales construidas

10

| Variante | Sustituciones |
|----------|---------------|
|----------|---------------|

|          |                                                                |
|----------|----------------------------------------------------------------|
| JN034N2  | N70K V54I F57L                                                 |
| JN035N2  | N70K M93L L94K N95D V96L                                       |
| JN036N2  | N70K A137I V139I                                               |
| JN037N2  | N70K I165L                                                     |
| JN038N2  | N70K L184Y Q185N S186A                                         |
| JN039N2  | N70K F212R A214V S215T                                         |
| JN040N2  | N70K A219T N220T                                               |
| JN041N2  | N70K T224A                                                     |
| JN042N2  | N70K N260K T262D                                               |
| JN043N2  | N70K I264L R266K                                               |
| JN044N2  | N70K S299N                                                     |
| JN045N2  | N70K N318G P320V I321V                                         |
| JN046N2  | N70K A323R T327V                                               |
| JN047N2  | N70K A349Q S351A V353I                                         |
| JN048N2  | N70K G356M                                                     |
| JN058N2  | N70K I83V Q84D A323R T327V                                     |
| JN059N2  | N70K L86P V102D A323R T327V                                    |
| JN060N2  | N70K V107I A323R T325S T327V                                   |
| JN061 N2 | N70K S172A A323R T325S T327V                                   |
| JN062N2  | N70K V209G A323R T325S T327V                                   |
| JN063N2  | V54I F57L N70K A323R T325S T327V                               |
| JN064N2  | N70K N260K T262D A323R T325S T327V                             |
| JN065N2  | N70K A323R T327V A349Q S351A V353I                             |
| JN066N2  | V54I F57L N70K N260K T262D A323R T325S T327V A349Q S351A V353I |
| JN067N2  | N70K I83V Q84D A323R T327V A349Q S351A V353I                   |
| JN068N2  | N70K V102D A323R T327V A349Q S351A V353I                       |
| JN069N2  | I83VQ84D N70K V102D A323R T327V A349Q S351A V353I              |

#### Ejemplo 7: evaluación de variantes dirigidas al sitio ancestrales construidas

- 5 [0174] Las variantes dirigidas al sitio del ejemplo 6 se evaluaron como se describe en el ejemplo 4 (excepto que la actividad restante después de tratamiento térmico se midió a 37°C en vez de a 55°C). JN001 N2 se incluyó, que sostiene pJN001 N2 que codifica la asparaginasa de *Aspergillus oryzae* de tipo salvaje. JN002N2 tiene la sustitución N70K.
- 10 Tabla 7. Actividad Residual a 37°C después incubación a dichas temperaturas durante 20 min. las actividades son descritas como un valor relativo a la actividad tras la incubación a 4°C.

|         | 4°C  | 64°C | 66°C | 68°C | 70°C | 72°C | 74°C |
|---------|------|------|------|------|------|------|------|
| JN034N2 | 100% | 47%  | 47%  | 2%   | -1%  |      |      |
| JN042N2 | 100% | 78%  | 27%  | 0%   | 0%   |      |      |
| JN046N2 | 100% | 82%  | 74%  | 46%  | 3%   |      |      |
| JN047N2 | 100% | 71%  | 66%  | 10%  | 0%   |      |      |
| JN058N2 | 100% |      | 80%  | 50%  | 8%   | 1%   | 0%   |
| JN059N2 | 100% |      | 72%  | 39%  | 6%   |      |      |
| JN065N2 | 100% |      | 89%  | 70%  | 57%  | 38%  | 3%   |
| JN067N2 | 100% |      |      | 73%  | 61%  | 32%  | 6%   |
| JN068N2 | 100% |      |      | 64%  | 44%  | 20%  | 3%   |

|         |      |     |     |    |    |    |    |
|---------|------|-----|-----|----|----|----|----|
| JN002N2 | 100% | 64% | 12% | 6% | 3% | 1% | 2% |
| JN001N2 | 100% |     |     | 5% | 2% | 1% | 2% |

**Ejemplo 8: calorimetría diferencial de barrido**

Variantes evaluadas:

[0175]

JN002N2Y es asparaginasa de *Aspergillus oryzae* de tipo salvaje que tiene la siguiente sustitución: N70K, la variante se expresa a partir de *S. cerevisiae*. JN065N2Y es asparaginasa de *Aspergillus oryzae* de tipo salvaje que tiene las siguientes sustituciones: N70K A323R T327V A349Q S351A V353I, la variante se expresa a partir de *S. cerevisiae*.

Preparación de la muestra para calorimetría diferencial de barrido (DCS):

[0176]

- Aprox. 1,5 ml de muestra se transfirió a un casete de diálisis Slide-A-Lyzer® (Pierce, nº cat. 66380, 10 kDa MWCO) y se dializó contra 500 ml de 50 mM de tampón MES pH 6,0 durante 1-1½ horas con agitación magnética en una cámara fría (aprox. 5°C).
- El tampón se cambió por un lote fresco de 500 ml de 50 mM MES pH 6,0 y se dejó dializar durante toda la noche.
- El tampón de diálisis se usó para supresión en la determinación de concentración por medición de absorción a 280 nm (A<sub>280</sub>) y como referencia para DSC.
- El volumen de la muestra se ajustó utilizando el tampón de diálisis hasta que se obtuvo un A<sub>280</sub> de aprox. 0,5-0,55. Utilizando un coeficiente de extinción calculado basado en datos de secuencia de aminoácidos (Vector NTI v. 9.0.0), esto corresponde a una concentración enzimática de aprox. 1,5-1,7 mg/ml.
- Las muestras se desgasificaron por succión de vacío y agitación magnética durante aprox. 10 minutos antes de cargar en el aparato de DSC.

Registro y tratamiento de datos de DSC:

[0177]

- Equipo: calorímetro VP-DSC (MicroCal™)
- Intervalo de muestreo: 20-80°C
- Velocidad de barrido: 60°C/h
- Software de procesamiento de datos: MicroCal Origin® v. 4.10. La temperatura de desnaturalización térmica (T<sub>d</sub>) se determinó como la temperatura que corresponde con el vértice de la señal en el termograma. Los datos se resumen en la tabla 8 a continuación.

Tabla 8:

| Célula huésped       | Enzima   | Tampón           | Velocidad de barrido (°C/h) | Intervalo de barrido (°C) | T <sub>d</sub> (°C) | A <sub>280</sub> |
|----------------------|----------|------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------|------------------|
| <i>S. cerevisiae</i> | JN002N2Y | 50 mM MES pH 6,0 | 60                          | 20-80                     | 64                  | 0,54             |
| <i>S. cerevisiae</i> | JN065N2Y | 50 mM MES pH 6,0 | 60                          | 20-80                     | 71                  | 0,50             |

**Ejemplo 9: ensayo de actividad de asparaginasa**

[0178] Una unidad de asparaginasa (ASNU) se define como la cantidad de enzima necesaria para generar 1,0 micromol de amoníaco en 1 minuto a 37°C y pH 7,0.

Soluciones madre

[0179]

- 50 MM tampón de Tris, pH 7,0
- 189 MM solución de L-asparaguina
- 1,5 M ácido tricloroacético (TCA)
- Reactivo de Nessler, Aldrich Stock nº 34,514-8 (Sigma-Aldrich)

Reacción enzimática

[0180]

500 microL tampón  
100 microL solución de L-asparaguina  
350 microL agua

se mezclan y se equilibran a 37°C. 100 microL de solución enzimática se añade y las reacciones se incuban a 37°C durante 30 minutos. Las reacciones se detienen colocándolas en hielo y añadiendo 50 microL de 1,5 M TCA. Las muestras se mezclan y se centrifugan durante 2 minutos a 20.000 g.

Medición de amonio libre

[0181] 50 microL de la mezcla reactiva enzimática se mezcla con 100 microL de agua y 50 microL de reactivo de Nessler y se mide la absorbancia a 436 nm después de 1 minuto.

[0182] La actividad se compara con un estándar conocido.

#### **Ejemplo 10: rendimiento de la aplicación de la variante termoestable JN065N2 en el tratamiento de patatas fritas para la reducción de acrilamida**

[0183] Se pelaron manualmente patatas Bintje (Grill-Kartoflen, Interfrugt Catering, Dinamarca) y se cortaron en forma de patatas fritas utilizando un cortador de patatas (Taglia patate), tamaño 0,8 x 0,8 cm. Los bastones de patata se dividieron en porciones de 150 g (asegurándose de que cada parte consistía en bastones de distintas patatas) y se mantuvieron en 400 ml de agua desionizada hasta su uso. Los bastones de patata se blanquearon en dos pasos por inmersión primero en 4 L de agua desionizada a 85°C durante 4 min y posteriormente en 400 ml de agua desionizada precalentada a 70°C durante 15 minutos. El tratamiento enzimático se hizo por inmersión de los bastones de patata blanqueados durante 1 min a 40°C en 300 ml de solución enzimática (en el agua desionizada) que tenía 10.000 ASNU/L de la variante termoestable JN065N2 del ejemplo 6 expresada a partir de *Aspergillus oryzae*. Para comparación se incluyó una muestra de control sin tratamiento enzimático (frita justo después del blanqueo). Las muestras se hicieron por duplicado. Después de tratamiento enzimático los bastones de patata se secaron en un armario caliente ventilado durante 10 min a 85°C y se prefrieron en aceite vegetal durante 1 min a 175°C. Las muestras se congelaron rápidamente y finalmente se frieron por segunda vez 3 min a 175°C.

[0184] Las frituras se mezclaron y la acrilamida se extrajo usando acetonitrilo y un extractor de solvente automatizado (ASE de Dionex). El extracto se trató con solución de Carrez I y II, se dejó durante toda la noche en la nevera y se filtró utilizando un filtro de jeringa de 0,22 micrómetros antes del análisis por HPLC (columna: Dionex IonPac ICE-AS1, 9 x 250 mm, eluyente: 5 mM de HCl, detección: UV 202 nm). Se identificó acrilamida y se cuantificó por comparación con estándares conocidos.

[0185] Los resultados se muestran en la tabla 9 más abajo.

Tabla 9:

| Tratamiento | Acrilamida, ppb |
|-------------|-----------------|
| Control     | 1190            |
| JN065N2     | 600             |

[0186] La acrilamida en el producto final de patata frita se ha reducido en un 50%, lo que muestra que la enzima es activa en esta aplicación. Para las reducciones típicas de la enzima de tipo salvaje es de alrededor de 50-60%, mientras que una inmersión en agua sin la enzima produce aproximadamente un 25% de reducción.

#### **Ejemplo 11: comparación de termoestabilidad de la variante JN065N2 y la enzima en peso en el tratamiento continuo de patatas fritas para la reducción de acrilamida**

[0187] Patatas Bintje (Grill-Kartoflen, Interfrugt Catering, Dinamarca) se pelaron manualmente y se cortaron en forma de patata frita utilizando un cortador de patatas fritas (Taglia patate), tamaño 0,8 x 0,8 cm. Los bastones de patata se dividieron en porciones de 150 g (asegurándose de que cada parte constaba de bastones de distintas patatas) y se mantuvieron en 400 ml de agua desionizada hasta su uso. Los bastones de patata se blanquearon en dos pasos por inmersión primero en 4L de agua desionizada a 85°C durante 4 min y posteriormente en 400 ml de agua desionizada precalentada a 70°C durante 15 minutos. Se llevó a cabo tratamiento enzimático manteniendo los bastones de patata blanqueados durante 5 min a 60°C en 1.500 ml de solución enzimática (en el agua desionizada) que tenía 10.000

ASNU/L de la variante termoestable JN065N2 del ejemplo 6 expresada a partir de *Aspergillus oryzae* o la enzima en peso. Cada 5 min una parte porción de bastones de patata blanqueados se sumergió en el baño enzimático para imitar un uso continuo del baño enzimático. Se tomaron muestras del baño enzimático cada 10-15 min durante un periodo total de 2-3 horas y se congelaron para analizar su actividad más tarde. Las patatas tratadas fueron descartadas.

5

[0188] Los resultados se muestran en la tabla 10 a continuación.

Tabla 10:

| JN065N2      |             | Enzima en peso |             |
|--------------|-------------|----------------|-------------|
| Tiempo (min) | % actividad | Tiempo (min)   | % actividad |
| 0            | 100         | 0              | 100         |
| 10           | 96          | 15             | 98          |
| 20           | 98          | 20             | 82          |
| 30           | 88          | 45             | 78          |
| 40           | 86          | 60             | 72          |
| 50           | 80          | 75             | 69          |
| 60           | 83          | 90             | 59          |
| 75           | 76          | 105            | 66          |
| 90           | 67          | 120            | 56          |
| 105          | 65          | 135            | 48          |
| 120          | 58          | 140            | 48          |
| 135          | 52          |                |             |
| 150          | 50          |                |             |
| 165          | 45          |                |             |
| 169          | 43          |                |             |

10

[0189] Tras el ajuste de las actividades enzimáticas medidas para una curva de decaimiento exponencial, se puede estimar una vida media ( $T_{1/2}$ ) de la enzima. Para la enzima en peso,  $T_{1/2}$  fue 135 min y para la variante termoestable JN065N2 157 min, que corresponde a un 16% de aumento.

15 Listado de secuencias

[0190]

&lt;110&gt; Novozymes A/S

20

&lt;120&gt; Variantes de asparaginasa

&lt;130&gt; 11123

25

&lt;160&gt; 12

&lt;170&gt; Versión de patentIn 3.5

&lt;210&gt; 1

30

&lt;211&gt; 378

&lt;212&gt; PRT

<213> *A. oryzae*

&lt;400&gt; 1

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

Val Ser Ala Phe Tyr Ala Ser Lys Thr Asn Ala Asn Thr Val Asp Thr  
 210 215 220  
 Phe Lys Ala Ile Glu Met Gly Asn Leu Gly Glu Val Val Ser Asn Lys  
 225 230 235 240  
 Pro Tyr Phe Phe Tyr Pro Pro Val Lys Pro Thr Gly Lys Thr Glu Val  
 245 250 255  
 Asp Ile Arg Asn Ile Thr Ser Ile Pro Arg Val Asp Ile Leu Tyr Ser  
 260 265 270  
 Tyr Glu Asp Met His Asn Asp Thr Leu Tyr Ser Ala Ile Asp Asn Gly  
 275 280 285  
 Ala Lys Gly Ile Val Ile Ala Gly Ser Gly Ser Gly Ser Val Ser Thr  
 290 295 300  
 Pro Phe Ser Ala Ala Met Glu Asp Ile Thr Thr Lys His Asn Ile Pro  
 305 310 315 320  
 Ile Val Ala Ser Thr Arg Thr Gly Asn Gly Glu Val Pro Ser Ser Ala  
 325 330 335  
 Glu Ser Ser Gln Ile Ala Ser Gly Tyr Leu Asn Pro Ala Lys Ser Arg  
 340 345 350  
 Val Leu Leu Gly Leu Leu Leu Ala Gln Gly Lys Ser Ile Glu Glu Met  
 355 360 365  
 Arg Ala Val Phe Glu Arg Ile Gly Val Ala  
 370 375

<210> 2

<211> 378

<212> PRT

<213> *A. niger*

<400> 2

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Pro | Leu | Lys | Pro | Ile | Leu | Leu | Ser | Ala | Leu | Ala | Ser | Leu | Ala | Ser |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Ala | Ser | Pro | Leu | Leu | Tyr | Ser | Arg | Thr | Thr | Asn | Glu | Thr | Phe | Val | Phe |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Thr | Asn | Ala | Asn | Gly | Leu | Asn | Phe | Thr | Gln | Met | Asn | Thr | Thr | Leu | Pro |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Asn | Val | Thr | Ile | Phe | Ala | Thr | Gly | Gly | Thr | Ile | Ala | Gly | Ser | Asp | Ser |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |

Ser Ser Thr Ala Thr Thr Gly Tyr Thr Ser Gly Ala Val Gly Val Leu  
 65 70 75 80  
 Ser Leu Ile Asp Ala Val Pro Ser Met Leu Asp Val Ala Asn Val Ala  
 85 90 95  
 Gly Val Gln Val Ala Asn Val Gly Ser Glu Asp Ile Thr Ser Asp Ile  
 100 105 110  
 Leu Ile Ser Met Ser Lys Lys Leu Asn Arg Val Val Cys Glu Asp Pro  
 115 120 125  
 Thr Met Ala Gly Ala Val Ile Thr His Gly Thr Asp Thr Leu Glu Glu  
 130 135 140  
 Thr Ala Phe Phe Leu Asp Ala Thr Val Asn Cys Gly Lys Pro Ile Val  
 145 150 155 160  
 Ile Val Gly Ala Met Arg Pro Ser Thr Ala Ile Ser Ala Asp Gly Pro  
 165 170 175  
 Phe Asn Leu Leu Glu Ala Val Thr Val Ala Ala Ser Thr Ser Ala Arg  
 180 185 190  
 Asp Arg Gly Ala Met Val Val Met Asn Asp Arg Ile Ala Ser Ala Tyr  
 195 200 205  
 Tyr Val Thr Lys Thr Asn Ala Asn Thr Met Asp Thr Phe Lys Ala Met  
 210 215 220  
 Glu Met Gly Tyr Leu Gly Glu Met Ile Ser Asn Thr Pro Phe Phe Phe  
 225 230 235 240  
 Tyr Pro Pro Val Lys Pro Thr Gly Lys Val Ala Phe Asp Ile Thr Asn  
 245 250 255  
 Val Thr Glu Ile Pro Arg Val Asp Ile Leu Phe Ser Tyr Glu Asp Met  
 260 265 270  
 His Asn Asp Thr Leu Tyr Asn Ala Ile Ser Ser Gly Ala Gln Gly Ile  
 275 280 285  
 Val Ile Ala Gly Ala Gly Ala Gly Gly Val Thr Thr Ser Phe Asn Glu  
 290 295 300  
 Ala Ile Glu Asp Val Ile Asn Arg Leu Glu Ile Pro Val Val Gln Ser  
 305 310 315 320  
 Met Arg Thr Val Asn Gly Glu Val Pro Leu Ser Asp Val Ser Ser Asp  
 325 330 335  
 Thr Ala Thr His Ile Ala Ser Gly Tyr Leu Asn Pro Gln Lys Ser Arg

```

          340          345          350
Ile Leu Leu Gly Leu Leu Leu Ser Gln Gly Lys Asn Ile Thr Glu Ile
      355      360      365
Ala Asp Val Phe Ala Leu Gly Thr Asp Ala
      370      375

```

5 <210> 3  
 <211> 374  
 <212> PRT  
 <213> A. fumigatus  
 <400> 3

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

Ile Val Ser Ala Tyr Tyr Val Ser Lys Thr Asn Ala Asn Thr Met Asp  
 210 215 220  
 Thr Phe Lys Ala Val Glu Met Gly Asn Leu Gly Ala Ile Ile Ser Asn  
 225 230 235 240  
 Lys Pro Tyr Phe Phe Tyr Pro Pro Val Met Pro Thr Gly Lys Thr Thr  
 245 250 255  
 Phe Asp Val Arg Asn Val Ala Ser Ile Pro Arg Val Asp Ile Leu Tyr  
 260 265 270  
 Ser Tyr Gln Asp Met Gln Asn Asp Thr Leu Tyr Asp Ala Val Asp Asn  
 275 280 285  
 Gly Ala Lys Gly Ile Val Val Arg Ser Val Ser Ser Gly Tyr Tyr Asp  
 290 295 300  
 Ala Ile Asp Asp Ile Ala Ser Thr His Ser Leu Pro Val Val Leu Ser  
 305 310 315 320  
 Thr Arg Thr Gly Asn Gly Glu Val Ala Ile Thr Asp Ser Glu Thr Thr  
 325 330 335  
 Ile Glu Ser Gly Phe Leu Asn Pro Gln Lys Ala Arg Ile Leu Leu Gly  
 340 345 350  
 Leu Leu Leu Ala Glu Asp Lys Gly Phe Lys Glu Ile Lys Glu Ala Phe  
 355 360 365  
 Ala Lys Asn Gly Val Ala  
 370

<210> 4

<211> 378

<212> PRT

5 <213> A. nidulans

<400> 4

Met Gly Leu Arg Val Lys Ala Leu Ala Val Ala Ala Leu Ala Thr Leu  
 1 5 10 15  
 Ser Gln Ala Ser Pro Val Leu Tyr Thr Arg Glu Asp Thr Thr Ser Asn  
 20 25 30  
 Thr Thr Tyr Ala Phe Thr Asn Ser Asn Gly Leu Asn Phe Thr Gln Met  
 35 40 45  
 Asn Thr Thr Leu Pro Asn Val Thr Ile Phe Ala Thr Gly Gly Thr Ile  
 50 55 60  
 Ala Gly Ser Ala Ala Ser Asn Thr Ala Thr Thr Gly Tyr Gln Ala Gly

|     |                    |     |                    |                   |     |     |
|-----|--------------------|-----|--------------------|-------------------|-----|-----|
| 65  |                    | 70  |                    | 75                |     | 80  |
| Ala | Leu                | Gly | Ile                | Gln <sub>85</sub> | Thr | Leu |
| Ile | Asp                | Ala | Val                | Pro               | Glu | Met |
| Leu | Ser                | Leu | Ser                | Asn               | Val | Gly |
| Ser | Pro                | Asp |                    |                   |     |     |
| Val | Ala                | Asn | Ile <sub>100</sub> | Ala               | Gly | Val |
| Gln | Ile <sub>105</sub> | Ser | Asn                | Val               | Gly | Ser |
| Pro | Asp                |     |                    |                   |     |     |
| Val | Thr                | Ser | Thr                | Ile               | Leu | Leu |
| Glu | Met                | Ala | His                | Arg               | Leu | Asn |
| Lys | Val                |     |                    |                   |     |     |
| Val | Cys                | Glu | Asp                | Pro               | Ser | Met |
| Ala | Gly                | Ala | Val                | Val               | Thr | His |
| Gly | Thr                |     |                    |                   |     |     |
| Asp | Thr                | Leu | Glu                | Glu               | Thr | Ala |
| Phe | Phe                | Leu | Asp                | Ala               | Thr | Val |
| Asn | Cys                |     |                    |                   |     |     |
| Gly | Lys                | Pro | Ile                | Val               | Ile | Val |
| Gly | Ala                | Met | Arg                | Pro               | Ala | Thr |
| Phe | Ile                |     |                    |                   |     |     |
| Ser | Ala                | Asp | Gly                | Pro               | Tyr | Asn |
| Leu | Leu                | Gln | Ala                | Val               | Thr | Val |
| Ala | Ser                |     |                    |                   |     |     |
| Thr | Lys                | Glu | Ala                | Arg               | Asn | Arg |
| Gly | Ala                | Met | Val                | Val               | Met | Asn |
| Asp | Arg                |     |                    |                   |     |     |
| Ile | Ala                | Ser | Ala                | Tyr               | Tyr | Val |
| Ser | Lys                | Thr | Asn                | Ala               | Asn | Thr |
| Met | Asp                |     |                    |                   |     |     |
| Thr | Phe                | Lys | Ala                | Val               | Glu | Met |
| Gly | Tyr                | Leu | Gly                | Ala               | Ile | Ile |
| Ser | Asn                |     |                    |                   |     |     |
| Thr | Pro                | Phe | Phe                | Tyr               | Tyr | Pro |
| Ala | Val                | Gln | Pro                | Ser               | Gly | Lys |
| Thr |                    |     |                    |                   |     |     |
| Val | Asp                | Val | Ser                | Asn               | Val | Thr |
| Ser | Ile                | Pro | Arg                | Val               | Asp | Ile |
| Leu | Tyr                |     |                    |                   |     |     |
| Ser | Phe                | Gln | Asp                | Met               | Thr | Asn |
| Ala | Gly                | Ser | Gly                | Ala               | Gly | Ser |
| Val | Asp                |     |                    |                   |     |     |
| Thr | Ala                | Phe | Ser                | Thr               | Ala | Ile |
| Asp | Asp                | Ile | Ile                | Ser               | Asn | Gln |
| Gly | Val                |     |                    |                   |     |     |
| Pro | Ile                | Val | Gln                | Ser               | Thr | Arg |
| Thr | Gly                | Asn | Gly                | Glu               | Val | Pro |
| Tyr | Ser                |     |                    |                   |     |     |
| Ala | Glu                | Gly | Gly                | Ile               | Ser | Ser |
| Gly | Ile                | Ser | Ser                | Gly               | Phe | Leu |
| Asn | Pro                | Ala | Lys                | Ser               | Arg |     |

Ile Leu Leu Gly Leu Leu Leu Ala Gln Gly Gly Lys Gly Thr Glu Glu  
355 360 365

Ile Arg Ala Val Phe Gly Lys Val Ala Val  
370 375

<210> 5

<211> 379

<212> PRT

5 <213> *Penicillium citrinum*

<220>

<221> misc\_feature

<222> (110)..(110)

10 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 5

Met Arg Leu Leu Phe Asn Thr Leu Ala Val Ser Ala Leu Ala Ala Thr  
1 5 10 15

Ser Tyr Ala Ser Pro Ile Ile His Ser Arg Ala Ser Asn Thr Ser Tyr  
20 25 30

Thr Asn Ser Asn Gly Leu Lys Phe Asn His Phe Asp Ala Ser Leu Pro  
35 40 45

Asn Val Thr Leu Leu Ala Thr Gly Gly Thr Ile Ala Gly Thr Ser Asp  
50 55 60

Asp Lys Thr Ala Thr Ala Gly Tyr Glu Ser Gly Ala Leu Gly Ile Asn  
65 70 75 80

Lys Ile Leu Ser Gly Ile Pro Glu Val Tyr Asp Ile Ala Asn Val Asn  
85 90 95

Ala Val Gln Phe Asp Asn Val Asn Ser Gly Asp Val Ser Xaa Ser Leu  
100 105 110

Leu Leu Asn Met Thr His Thr Leu Gln Lys Thr Val Cys Asp Asp Pro  
115 120 125

Thr Ile Ser Gly Ala Val Ile Thr His Gly Thr Asp Thr Leu Glu Glu  
130 135 140

Ser Ala Phe Phe Ile Asp Ala Thr Val Asn Cys Gly Lys Pro Ile Val  
145 150 155 160

Phe Val Gly Ser Met Arg Pro Ser Thr Ala Ile Ser Ala Asp Gly Pro  
165 170 175

Met Asn Leu Leu Gln Gly Val Thr Val Ala Ala Asp Lys Gln Ala Lys  
180 185 190

Asn Arg Gly Ala Leu Val Val Leu Asn Asp Arg Ile Val Ser Ala Phe  
 195 200 205  
 Phe Ala Thr Lys Thr Asn Ala Asn Thr Met Asp Thr Phe Lys Ala Tyr  
 210 215 220  
 Glu Gln Gly Ser Leu Gly Met Ile Val Ser Asn Lys Pro Tyr Phe Tyr  
 225 230 235 240  
 Tyr Pro Ala Val Glu Pro Asn Ala Lys His Val Val His Leu Asp Asp  
 245 250 255  
 Val Asp Ala Ile Pro Arg Val Asp Ile Leu Tyr Ala Tyr Glu Asp Met  
 260 265 270  
 His Ser Asp Ser Leu His Ser Ala Ile Lys Asn Gly Ala Lys Gly Ile  
 275 280 285  
 Val Val Ala Gly Glu Gly Ala Gly Gly Ile Ser Thr Asp Phe Ser Asp  
 290 295 300  
 Thr Ile Asp Glu Ile Ala Ser Lys His Gln Ile Pro Ile Ile Leu Ser  
 305 310 315 320  
 His Arg Thr Val Asn Gly Glu Val Pro Thr Ala Asp Ile Thr Gly Asp  
 325 330 335  
 Ser Ala Lys Thr Arg Ile Ala Ser Gly Met Tyr Asn Pro Gln Gln Ala  
 340 345 350  
 Arg Val Leu Leu Gly Leu Leu Leu Ala Glu Gly Lys Lys Phe Glu Asp  
 355 360 365  
 Ile Arg Thr Ile Phe Gly Lys Ala Thr Val Ala  
 370 375

<210> 6  
 <211> 375  
 <212> PRT  
 <213> *A. terreus*  
 <400> 6

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Gly | Phe | Asn | Ile | Lys | Ala | Leu | Thr | Val | Ala | Ala | Leu | Ala | Ala | Leu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     | 15  |     |     |
| .   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Gly | His | Ala | Ser | Pro | Leu | Tyr | Ser | Arg | Ala | Asp | Ala | Asn | Val | Thr | Tyr |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| .   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Val | Phe | Thr | Asn | Ala | His | Gly | Leu | Asn | Phe | Thr | Gln | Met | Asn | Thr | Thr |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |

Leu Pro Asn Val Thr Ile Leu Ala Thr Gly Gly Thr Ile Ala Gly Ser  
 50 55 60  
 Ser Ala Asp Asn Thr Ala Thr Thr Gly Tyr Lys Ala Gly Ala Ile Gly  
 65 70 75 80  
 Ile Gln Gln Leu Ile Asp Ala Val Pro Glu Met Leu Asn Val Ala Asn  
 85 90 95  
 Val Ala Gly Val Gln Val Thr Asn Val Gly Ser Pro Asp Val Thr Ser  
 100 105 110  
 His Ile Leu Leu Asp Met Val Arg Met Leu Asp Glu Leu Val Cys Gln  
 115 120 125  
 Asp Glu Thr Met Ala Gly Ala Val Ile Thr His Gly Thr Asp Thr Leu  
 130 135 140  
 Glu Glu Thr Ala Phe Phe Leu Asp Ala Thr Met Pro Cys Arg Lys Pro  
 145 150 155 160  
 Val Val Val Val Gly Ala Met Arg Pro Ser Thr Ala Ile Ser Ala Asp  
 165 170 175  
 Gly Pro Phe Asn Leu Leu Gln Ser Val Thr Val Ala Ala Thr Pro Ala  
 180 185 190  
 Ala Arg Asp Arg Gly Ala Leu Val Val Leu Asn Asp Arg Val Leu Ser  
 195 200 205  
 Ala Phe Tyr Thr Ser Lys Thr Asn Ala Asn Thr Met Asp Thr Phe Lys  
 210 215 220  
 Ala Ile Glu Met Gly Ala Leu Ala Ala Ile Val Ser Asn Lys Pro Tyr  
 225 230 235 240  
 Phe Tyr Tyr Pro Pro Val Arg Pro Thr Gly His Glu Phe Phe Asp Val  
 245 250 255  
 Arg Asn Val Ser Ala Leu Pro Arg Val Asp Ile Leu Tyr Ser Tyr Gln  
 260 265 270  
 Asp Met Gln Asn Asp Thr Leu Tyr Asp Ala Ala Lys Asn Gly Ala Lys  
 275 280 285  
 Gly Ile Val Ile Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ser Val Ser Ser Gly Phe  
 290 295 300  
 Ser Ala Ala Ile Glu Asp Val Met Asp Thr Tyr His Ile Pro Val Val  
 305 310 315 320  
 Ala Ser Thr Arg Thr Gly Asn Gly Glu Val Pro Pro Ser Asp Asp Gly

325

330

335

Ala Ile Gly Ser Gly Phe Leu Asn Pro Gln Lys Ser Arg Ile Trp Leu  
340 345 350

Glu Leu Leu Leu Met Gln Lys Lys Thr Val Ala Glu Val Arg Glu Met  
355 360 365

Phe Ala Lys Val Ala Val Ala  
370 375

<210> 7

<211> 41

<212> ADN

<213> Cebador cultipre-asparaN2

<400> 7

Agccttggtg ctgctctccc cgccacagac tgaacgtca c 41

<210> 8

<211> 50

<212> ADN

<213> Cebador R AsparaC

<400> 8

Agtcaccctc tagatctcga cctaattaat caagcaaccc caatccgctc 50

<210> 9

<211> 255

<212> PRT

<213> Secuencia ancestral inferida nodo19

<400> 9

Pro Asn Ile Val Ile Leu Ala Thr Gly Gly Thr Ile Ala Gly Ala Ala  
1 5 10 15

Ala Ser Ala Thr Val Asp Thr Leu Ile Glu Ala Val Pro Glu Leu Lys  
20 25 30

Asp Leu Ala Asn Val Lys Gly Glu Gln Val Ala Asn Ile Gly Ser Glu  
35 40 45

Asp Met Asn Asn Glu Ile Leu Leu Lys Leu Gly Ile Val Ile Thr His  
50 55 60

Gly Thr Asp Thr Leu Glu Glu Thr Ala Tyr Phe Leu Asn Leu Thr Val  
65 70 75 80

Lys Ser Asp Lys Pro Val Val Leu Val Gly Ala Met Arg Pro Ala Thr  
85 90 95

Ala Ile Ser Ala Asp Gly Pro Met Asn Leu Tyr Asn Ala Val Ala Val  
100 105 110

Ala Ala Asp Lys Glu Ala Arg Gly Lys Gly Val Leu Val Val Met Asn

<210> 10

<211> 255

<212> PRT

<213> Secuencia ancestral inferida nodo20

<400> 10

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

<210> 11

<211> 333

<212> PRT

<213> Secuencia ancestral inferida V19

<400> 11

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

|       |    |
|-------|----|
| <210> | 12 |
| <211> | 33 |
| <212> | PR |
| <213> | Se |
| <400> | 12 |

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

Asp Ala Ala Asp Asp Ala Lys Leu Gly Val Ala Ala Gly Asp Leu Asn  
 290 295 300

Pro Gln Lys Ala Arg Ile Leu Leu Met Leu Ala Leu Thr Lys Thr Lys  
 305 310 315 320

Asp Pro Lys Glu Ile Gln Arg Tyr Phe Asp Glu Tyr  
 325 330

## REIVINDICACIONES

## 1. Método para preparar un polipéptido que comprende:

- 5 (a) proporcionar una secuencia de aminoácidos de un polipéptido original que tiene actividad de asparaginasa;  
 (b) seleccionar al menos un residuo de aminoácido en una posición de la secuencia que corresponda a cualquiera de las posiciones 54, 57, 70, 83, 84, 86, 102, 137, 164, 196, 201, 228, 260, 262, 278, 283, 290, 307, 312, 323, 327, 334, 336, 337, 349, 351, 353, 366 y/o 375 en SEC ID nº: 1;  
 (c) modificar la secuencia por sustitución del residuo de aminoácido seleccionado;  
 10 (d) producir una variante de polipéptido que tenga la secuencia modificada;  
 (e) probar la variante de polipéptido para actividad de asparaginasa y termotolerancia; y  
 (f) seleccionar una variante de polipéptido con actividad de asparaginasa y termotolerancia más alta en comparación con el polipéptido original.

- 15 2. Método según la reivindicación 1, donde la secuencia del polipéptido original tiene al menos 50% de identidad con los aminoácidos 80-378 de SEC ID nº: 1, los aminoácidos 80-378 de SEC ID nº: 2, los aminoácidos 80-374 de SEC ID nº: 3, los aminoácidos 80-378 de SEC ID nº: 4, los aminoácidos 80-379 de SEC ID nº: 5 o los aminoácidos 80-375 de SEC ID nº: 6.

- 20 3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la termotolerancia más alta comprende una actividad de asparaginasa más alta tras la incubación con pH 6 a una temperatura de al menos 64°C durante 20 minutos.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la termotolerancia más alta comprende una actividad de asparaginasa relativa más alta con pH 6 a 65°C en comparación con 37°C.

- 25 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la secuencia es modificada por al menos una de las siguientes sustituciones: 54I, 57L, 70H/K/S, 83V, 84D, 86P, 102D, 137S, 164D, 196I, 201Q, 228V, 260K, 262D, 278H/Q, 283C, 290V, 307A, 312Y, 323R, 327V, 334F, 336C/G/L, 337F/I, 349Q, 351A, 353I, 366P y/o 375T, donde cada posición corresponde a una posición de los aminoácidos 1 a 378 de SEC ID nº: 1.

- 30 6. Polipéptido que:

- (a) tiene actividad de asparaginasa;  
 (b) tiene al menos 70% de identidad con los aminoácidos 80 a 378 de SEC ID nº: 1;  
 35 (c) comprende al menos una de las siguientes sustituciones: 54I, 57L, 70H/K, 84D, 86P, 102D, 137S, 164D, 196I, 201Q, 228V, 260K, 262D, 278H/Q, 283C, 290V, 307A, 312Y, 323R, 327V, 334F, 336C/G/L, 337F/I, 351A, 366P y/o 375T, donde cada posición corresponde a una posición de los aminoácidos 1 a 378 de SEC ID nº: 1; y  
 (d) muestra una actividad de asparaginasa residual después del tratamiento térmico de al menos 50% de la actividad de asparaginasa sin tratamiento térmico, donde el tratamiento térmico es incubación con pH 6 a una temperatura de al menos 64°C durante 20 minutos.

7. Polipéptido que:

- (a) tiene actividad de asparaginasa;  
 45 (b) tiene al menos 70% de identidad con los aminoácidos 80 a 378 de SEC ID nº: 1;  
 (c) comprende al menos una de las siguientes sustituciones: 54I, 57L, 70H/K, 84D, 86P, 102D, 137S, 164D, 196I, 201Q, 228V, 260K, 262D, 278H/Q, 283C, 290V, 307A, 312Y, 323R, 327V, 334F, 336C/G/L, 337F/I, 351A, 366P y/o 375T, donde cada posición corresponde a una posición de los aminoácidos 1 a 378 de SEC ID nº: 1; y  
 50 (d) muestra una actividad de asparaginasa a pH 6 que es al menos 25% más alta a 65°C que a 37°C.

8. Polipéptido que:

- (a) tiene actividad de asparaginasa;  
 (b) tiene al menos 80% de identidad con los aminoácidos 80 a 378 de SEC ID nº: 1;  
 55 (c) comprende una sustitución en una posición que corresponde a cualquiera de las posiciones 54, 57, 70, 83, 84, 86, 102, 137, 164, 196, 201, 228, 260, 262, 278, 283, 290, 307, 312, 323, 327, 334, 336, 337, 349, 351, 353, 366 y/o 375 en SEC ID nº: 1; y  
 (d) muestra una actividad de asparaginasa residual después del tratamiento térmico de al menos 50% de la actividad de asparaginasa sin tratamiento térmico, donde el tratamiento térmico es incubación con pH 6 a una temperatura de al menos 64°C durante 20 minutos.

9. Polipéptido según la reivindicación 8, que comprende al menos una de las siguientes sustituciones: 54I, 57L, 70H/K/S, 83V, 84D, 86P, 102D, 137S, 164D, 196I, 201 Q, 228V, 260K, 262D, 278H/Q, 283C, 290V, 307A, 312Y, 323R, 327V, 334F, 336C/G/L, 337F/I, 349Q, 351A, 353I, 366P y/o 375T.

10. Polipéptido según la reivindicación 9, que comprende al menos una de las siguientes sustituciones: 54I, 57L, 70H/K, 84D, 86P, 102D, 137S, 164D, 196I, 201Q, 228V, 260K, 262D, 278H/Q, 283C, 290V, 307A, 312Y, 323R, 327V, 334F, 336C/G/L, 337F/I, 351A, 366P y/o 375T.
- 5 11. Polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, que comprende una de las siguientes sustituciones: N70H o N70K.
12. Polipéptido según la reivindicación 11, que comprende la sustitución N70K.
- 10 13. Polipéptido según la reivindicación 12, que comprende además al menos una de las siguientes sustituciones: 323R, 327V, 349Q, 351A y/o 353I.
14. Secuencia de ácidos nucleicos aislada que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 13.
- 15 15. Constructo de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de ácidos nucleicos según la reivindicación 14 operativamente enlazada a una o varias secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un huésped de expresión adecuado.
- 20 16. Célula huésped recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos según la reivindicación 15 y/o un vector de expresión que comprende tal constructo de ácidos nucleicos.
17. Método para producir el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 13, el método comprende:
- 25 (a) cultivo de la célula huésped según la reivindicación 16 para producir un sobrenadante que incluya el polipéptido; y  
(b) recuperación del polipéptido.
18. Método para producir un producto alimenticio, que comprende:
- 30 (a) facilitar un material alimenticio; y  
(b) tratar el material alimenticio con el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 13.

**Alineamiento de asparaginasas de 6 especies eucariotas**

|              |              |                       |
|--------------|--------------|-----------------------|
| SEC ID Nº: 1 | Asparaginasa | Aspergillus orizae    |
| SEC ID Nº: 2 | Asparaginasa | Aspergillus niger     |
| SEC ID Nº: 3 | Asparaginasa | Aspergillus fumigatus |
| SEC ID Nº: 4 | Asparaginasa | Aspergillus nidulans  |
| SEC ID Nº: 5 | Asparaginasa | Penicillium citrinum  |
| SEC ID Nº: 6 | Asparaginasa | Aspergillus terreus   |

|              |                                                                   |
|--------------|-------------------------------------------------------------------|
| SEC ID Nº: 5 | ---MRLLENTLAVSALAATSYPASPIIHSRA---SNTSY--TNSNGLKFNFHFDASLPNVITLLA |
| SEC ID Nº: 2 | ---MPLKPILLSALASLASASPLLYSRT---TNETFVFTNANGLNFTQMNTTLPNVITIFA     |
| SEC ID Nº: 4 | -MGLRVKALAVAAALATLSQASPVLYTREDTTSNTTYAFTNSNGLNFTQMNTTLPNVITIFA    |
| SEC ID Nº: 1 | -MGVNFVKVLAALATISHASPLLYPRA-TDSNVTYVFTNPGLNFTQMNTTLPNVITIFA       |
| SEC ID Nº: 3 | MTKLSFKIITLAAMIAGVNASPFVYPRA-TSPNSTYVFTNSHGLNFTQMNTTLPNVITILA     |
| SEC ID Nº: 6 | -MGFNIKALTVAALALGHASPL-YSRA--DANVTYVFTNAHGLNFTQMNTTLPNVITILA      |
| SEC ID Nº: 5 | TGGTIAGTSDDKTATAGYESGALGINKILSGIPEVYDIANVNAVQFDNVNSGDVSSSSLL      |
| SEC ID Nº: 2 | TGGTIAGSDSSSTATTGYTSGAVGVLSLIDAVPSMLDVANVAGVQVANVGSEDTSDILI       |
| SEC ID Nº: 4 | TGGTIAGSAASNTATTGYQAGALGIQTLIDAVPEMLSVANIAGVQISNVGSPDVTSTILL      |
| SEC ID Nº: 1 | TGGTIAGSSADNTATTGYKAGAVGIQTLIDAVPEMLNVANVAGVQVTNVGSPDITSDILL      |
| SEC ID Nº: 3 | TGGTIAGSSNDNTATTGYTAGAIGIQQLMDAVPEMLDVANVAGIQVANVGSPDVTSSLL       |
| SEC ID Nº: 6 | TGGTIAGSSADNTATTGYKAGAVGIQQLIDAVPEMLNVANVAGVQVTNVGSPDVTSHILL      |
| SEC ID Nº: 5 | NMTHTLQKTVCDPTISGAVITHGDTLEESAFFIDATVNCCKPIVIVGSMRPSAISAD         |
| SEC ID Nº: 2 | SMSKKLNRVCCDPTMAGAVITHGDTLEETAFFLDATVNCCKPIVIVGAMRPSAISAD         |
| SEC ID Nº: 4 | EMAHRLNKVCCDPSMAGAVVTHGDTLEETAFFLDATVNCCKPIVIVGAMRPATAISAD        |
| SEC ID Nº: 1 | RLSKQINEVVCNDPTMAGAVVTHGDTLEESAFFLDATVNCCKPIVIVGAMRPSAISAD        |
| SEC ID Nº: 3 | HMARTINEVVCDDPTMSGAVITHGDTLEETAFFLDATVNCCKPIVIVVGMARPSAISAD       |
| SEC ID Nº: 6 | DMVRMLDELVCQDETMAVITHGDTLEETAFFLDATMPCRKPVVVVGAMRPSAISAD          |
| SEC ID Nº: 5 | GPMNLLQGVTVAAADKQAKNRGALVVLNDRIVSAFFATKTNANTMDTFKAYEQGSLGMIVS     |
| SEC ID Nº: 2 | GPYNLLQAVTVAASTASDRGAMVVMNDRIASAYYVTKTNANTMDTFKAMEMGYLGEMIS       |
| SEC ID Nº: 4 | GPYNLLQAVTVASTKEARNRGAMVVMNDRIASAYYVSKTNANTMDTFKAVEMGYLGAIIS      |
| SEC ID Nº: 1 | GPNLLQGVTVAAAPKARDRGALVVMNDRIVSAYYASKTNANTMDTFKAIEMGNLGEVVS       |
| SEC ID Nº: 3 | GPYNLLQAVTVAAHPTARNRGALVVMNDRIVSAYYVSKTNANTMDTFKAVEMGNLGAIIIS     |
| SEC ID Nº: 6 | GPYNLLQGVTVAAAPARDRGALVVLNDRVLSAFYTSKTNANTMDTFKAIEMGALAAIVS       |
| SEC ID Nº: 5 | NKPYFFYPPEVPAKHVVHLDVDAIPRVDILYAYEDMHSDSLHSAIKNGAKGIVVAGG         |
| SEC ID Nº: 2 | NTPFYFFYPVQKPTGKVAFDITNVTIIPRVDILYSYEDMHNNTLYNAISSGAQGVIVAGG      |
| SEC ID Nº: 4 | NTPFYFFYPVQPSGKTTVDVSNVTIIPRVDILYSYQDMNTDLYSSIENGAKGVIVAGG        |
| SEC ID Nº: 1 | NKPYFFYPVQKPTGKTEVDIRNITSIIPRVDILYSYEDMHNNTLYSAIDNGAKGIVIVAGG     |
| SEC ID Nº: 3 | NKPYFFYPVQKPTGKTTFDVRNVASIPRVDILYSYQDMQNDTLYDAVDNGAKGIVIVAGG      |
| SEC ID Nº: 6 | NKPYFFYPVQKPTGHEFFDVRNVASIPRVDILYSYQDMQNDTLYDAKNGAKGIVIVAGG       |
| SEC ID Nº: 5 | AGGISTDFSDTIDEIASKHQIPIILSHRTVNGEVPTADITGDSAKTRIASGMYNPQQARV      |
| SEC ID Nº: 2 | AGGVTTSPNEAIEDVINRLEIPVQSMRTVNGEVPLSDVSSDTA-THIASGYNLPQKSRI       |
| SEC ID Nº: 4 | AGSVDTAFSTAIDDIISNQGVPIVQSTRGTNGEVPPSA-E-----GGISSGFLNPAKSRI      |
| SEC ID Nº: 1 | SGSVSTPFSAAMEDITTKHNIPIVASTRTGNGEVPPSAES-----SQIASGYNLPQKSRI      |
| SEC ID Nº: 3 | AGSVSSGYDAIDDIASHTSLPVVLSRTGTNGEVVAITDSE-----TTIESGFLNPAKSRI      |
| SEC ID Nº: 6 | AGSVSSGFSAAIEDVMDTYHIIPVASTRTGTNGEVPPSD-D-----GAIGSGFLNPAKSRI     |
| SEC ID Nº: 5 | LLGLLLA-E-GKKFEDIRTFGKATVA                                        |
| SEC ID Nº: 2 | LLGLLLSQ-GKNITEIADVFALGTDA                                        |
| SEC ID Nº: 4 | LLGLLLAQGGKGTETIRAVFGKVAV-                                        |
| SEC ID Nº: 1 | LLGLLLAQ-GKSIEMRAVFERIGVA                                         |
| SEC ID Nº: 3 | LLGLLLA-E-DKGFKEIKEAFKNGVA                                        |
| SEC ID Nº: 6 | WLELLLMQ-KKTVAEVRMFARVAVA                                         |

**Figura 1**

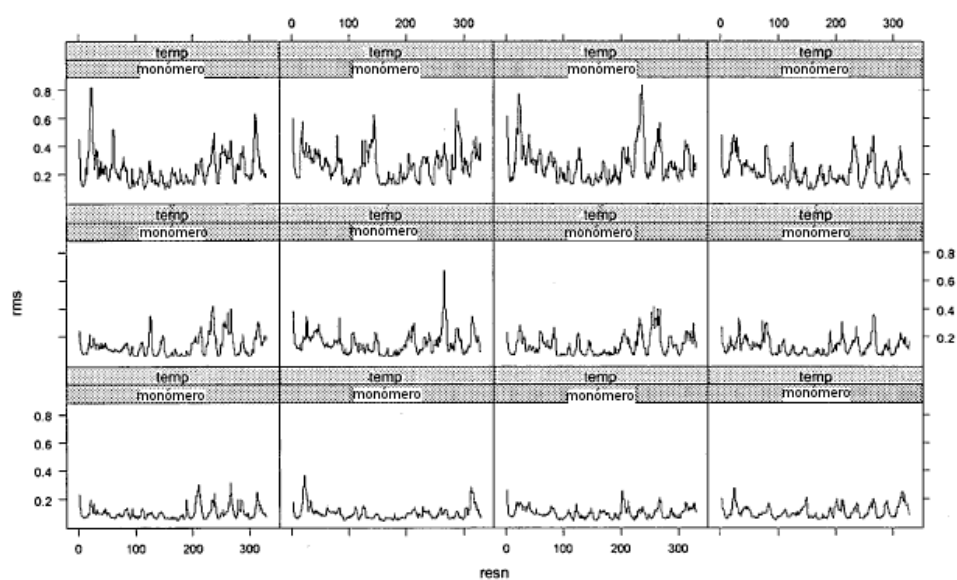
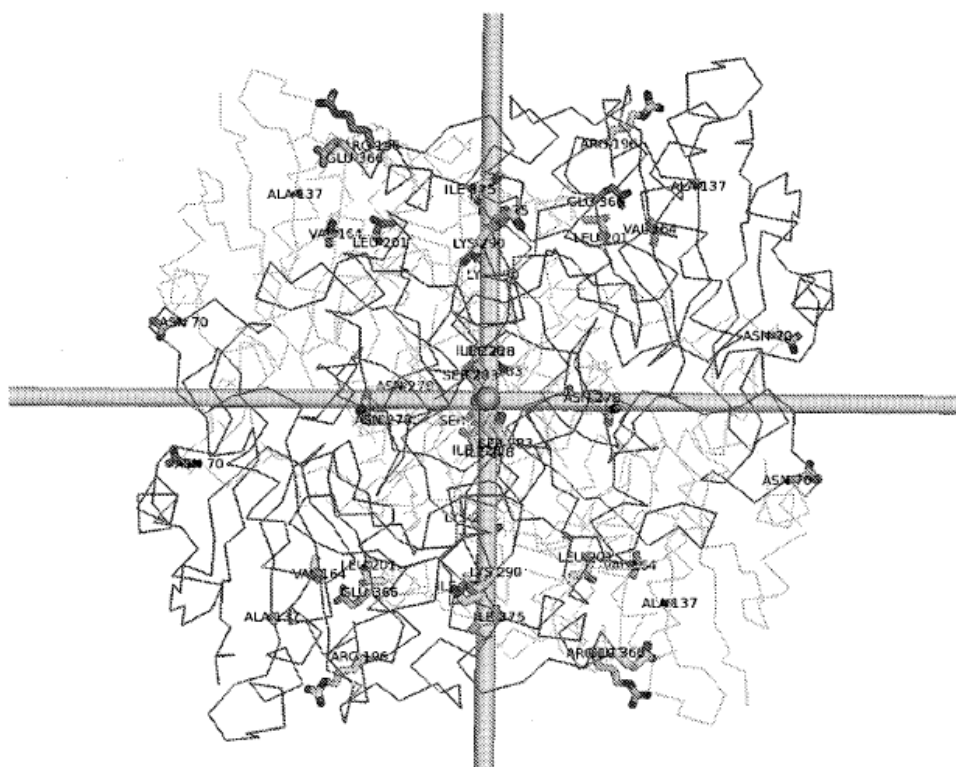


Figura 2



### Figura 3

**Archivo de parámetro para Simulación de Dinámica Molecular**

**em.mdp**

```
; VARIAS OPCIONES DE PROCESAMIENTO =
título                               =
cpp                                  = /lib/cpp
incluye                              =
define                               = -DEFLEXIBLE

; PARÁMETROS DE CONTROL DE EJECUCIÓN =
integrador                           = pendiente
; tiempo de inicio y paso de tiempo en ps =
tinit                                =0
dt                                    =0,001
nsteps                               =100

; OPCIONES DE MINIMIZACIÓN DE ENERGÍA =
emto1                                =0,00001
emstep                                =0,1
nstcgsteep                           = 1000
```

**Figura 4**

**Archivo de parámetro para Simulación de Dinámica Molecular****md.mdp**

```

título                = asparaginasa
cpp                   = /lib/cpp
restricciones          = todos los enlaces
integrador             = md
dt                    = 0,002; ps !
nsteps                = 5000; total 5 ps.
nstcomm               = 1
nstxout               = 50
nstvout               = 0
nstfout               = 0
nstlist               = 10
ns_type               = rejilla
rlist                 = 1,0
rcoulomb              = 1,0
rvdw                  = 1,0
; Acoplamiento de temperatura de Berendsen está activo en dos grupos
Tcoupl                = berendsen
tau_t                = 0,1 0,1
tc-grps               = proteína sol
ref_t                 = 300 300
; Acoplamiento de presión no está activo
Pcoupl                = no
tau_p                 = 0,5
compresibilidad        = 4,5e-5
ref_p                 = 1,0
; Velocidades generadas está activo a 300 K.
gen_vel               = sí
gen_temp              = 300,0
gen_seed              = 173529

```

**Figura 5**

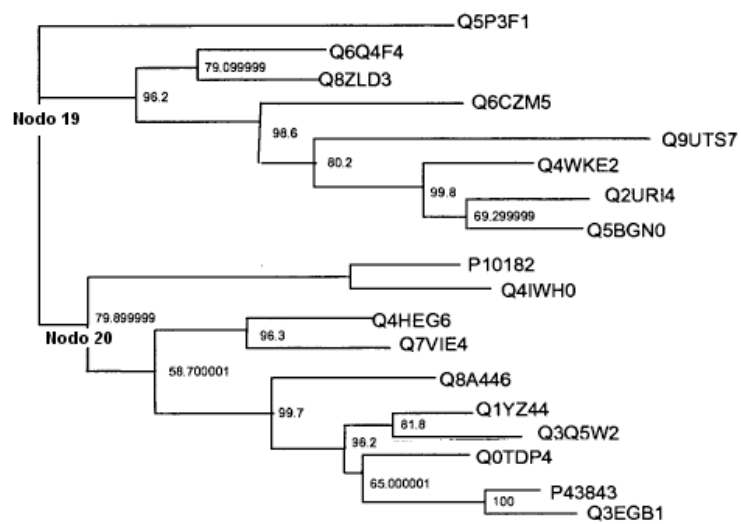


Figura 6