

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 343**

51 Int. Cl.:

C12N 9/82 (2006.01)

A23L 1/03 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

C07K 14/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2008 E 08749598 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.09.2014 EP 2139997**

54 Título: **Variantes de la enzima asparaginasa y sus usos**

30 Prioridad:

20.04.2007 EP 07106660

20.04.2007 EP 07106662

20.04.2007 EP 07106620

20.04.2007 EP 07106612

20.04.2007 EP 07106664

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

05.12.2014

73 Titular/es:

DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)

HET OVERLOON 1

6411 TE HEERLEN, NL

72 Inventor/es:

LAAN, VAN DER, JAN METSKE;

STOR, MARK, CRISTIAAN;

LANGHE, DE, ILSE y

MOHRMANN, LISETTE

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 524 343 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

Variantes de la enzima asparaginasa y sus usos

Campo de la invención

5 La invención se refiere a variantes de polipéptidos de asparaginasa y a secuencias polinucleotídicas que comprenden genes que codifican estas variantes de asparaginasa. La invención se refiere a un método para identificar variantes adecuadas de asparaginasa. La invención también se refiere a métodos para usar estas proteínas variantes en procedimientos industriales. También se incluyen en la invención células transformadas con un polinucleótido según la invención adecuadas para producir estas proteínas y células, en las que una proteína según la invención se modifica genéticamente para potenciar o reducir su actividad y/o nivel de expresión. La
10 invención también se refiere a métodos para usar las variantes de asparaginasa en procedimientos industriales.

Antecedentes de la invención

15 Recientemente, se ha publicado la aparición de acrilamida en un número de productos alimentarios calentados (Tareke et al. Chem. Res. Toxicol. 13, 517-522 (2000)). Puesto que la acrilamida es considerada como probablemente carcinogénica para animales y seres humanos, este hallazgo ha dado como resultado una preocupación a nivel mundial. La investigación adicional reveló que son detectables cantidades considerables de acrilamida en una variedad de alimentos habituales cocinados, fritos o preparados en el horno, y se demostró que la aparición de acrilamida en los alimentos fue el resultado del procedimiento de calentamiento.

20 Una vía para la formación de acrilamida a partir de aminoácidos y azúcares reductores como resultado de la reacción de Maillard se ha propuesto por Mottram et al. Nature 419:448 (2002). Según esta hipótesis, la acrilamida se puede formar durante la reacción de Maillard. Durante la cocción y el asado, la reacción de Maillard es principalmente responsable del color, olor y sabor. Una reacción asociada con la reacción de Maillard es la degradación de Strecker de aminoácidos, y se ha propuesto una vía hacia la acrilamida. La formación de acrilamida se hizo detectable cuando la temperatura superó 120°C, y se observó la tasa más elevada de formación a alrededor de 170°C. Cuando estaban presentes asparagina y glucosa, se pudieron observar los niveles más elevados de
25 acrilamida, mientras que la glutamina y ácido aspártico sólo dieron como resultado cantidades en trazas.

El límite de migración oficial en la UE para acrilamida que migra al alimento desde plásticos de contacto con alimentos está establecido a 10 ppm (10 microgramos por kilogramo). Aunque todavía no se ha establecido ningún límite oficial para acrilamida que se forma durante la cocción, el hecho de que un lote de producto supere este valor, especialmente cereales, productos del pan, y productos a base de patata y de maíz, provoca preocupación.

30 Se sabe que varias materias primas vegetales contienen niveles sustanciales de asparagina. En patatas, la asparagina es el aminoácido libre dominante (940 mg/kg, que corresponde a 40% del contenido total de aminoácidos), y en harina de trigo, la asparagina está presente como un nivel de alrededor de 167 mg/kg, que corresponde al 14% del conjunto de aminoácidos libres totales (Belitz y Grosch en Food Chemistry - Springer Nueva York, 1999). El hecho de que la acrilamida se forma principalmente a partir de asparagina (combinada con azúcares reductores) puede explicar los niveles elevados de acrilamida en productos vegetales fritos, cocinados en el horno o
35 asados. Por lo tanto, en interés de la salud pública, existe la necesidad urgente de productos alimentarios que tengan niveles sustancialmente menores de acrilamida, o, preferiblemente, estén desprovistos de ella.

40 Se ha propuesto una variedad de soluciones para disminuir el contenido de acrilamida, ya sea alterando las variables del procesamiento, por ejemplo la temperatura o duración de la etapa de calentamiento, o evitando química o enzimáticamente la formación de acrilamida, o eliminando la acrilamida formada.

En varias solicitudes de patente se ha descrito el uso de asparaginasa para disminuir el nivel de asparagina, y de ese modo la cantidad de acrilamida formada. Las asparaginastas adecuadas para este fin se han producido a partir de varias fuentes fúngicas, como por ejemplo *Aspergillus niger* en el documento WO 2004/030468 y *Aspergillus oryzae* en el documento WO 04/032648.

45 Aunque todas las L-asparaginastas catalizan la misma conversión química, esto no significa que son adecuadas para las mismas aplicaciones. Diversas aplicaciones exigirán diferentes demandas en las condiciones en las que las enzimas han de operar. Los parámetros físicos y químicos que pueden influir en la velocidad de una conversión enzimática son la temperatura (que tiene un efecto positivo sobre las velocidades de reacción química, pero puede tener un efecto negativo sobre la estabilidad de la enzima), el contenido de humedad, el pH, la concentración de sal,
50 la integridad estructural de la matriz alimentaria, la presencia de activadores o inhibidores de la enzima, la concentración del sustrato y productos, etc.

Por lo tanto, existe una necesidad continuada de asparaginastas mejoradas para varias aplicaciones, que tengan propiedades mejoradas.

Objeto de la invención

Es un objeto de la invención proporcionar nuevos polipéptidos variantes de asparaginasa, y polinucleótidos que codifican tales variantes. Un objeto adicional es proporcionar cepas recombinantes que produzcan tales variantes de asparaginasa. También, un método para identificar variantes es parte de la invención, así como métodos para obtener y usar los polinucleótidos y polipéptidos según la invención.

5 Sumario de la invención

La invención proporciona una variante de polipéptido de asparaginasa que tiene al menos 80% de identidad con la secuencia polipeptídica como se expone en SEC ID NO: 3, que, cuando se alinea con la secuencia expuesta en SEC ID NO: 3, comprende una sustitución de un resto de aminoácido que corresponde a cualquiera de los aminoácidos 53, 63, 66 u 88, definiéndose dichas posiciones con referencia a SEC ID NO: 3; y en la que la variante tiene una actividad específica que es mayor a al menos un pH que aquella del polipéptido como se expone en SEC ID NO: 3 medida al mismo pH, y/o en la que la variante tiene un óptimo de pH que es mayor que el del polipéptido como se expone en SEC ID NO: 3.

La invención también proporciona:

- una secuencia de ácido nucleico que codifica tal variante;
- 15 - un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una variante de la invención enlazada operablemente a una o más secuencias de control capaces de dirigir la expresión de una asparaginasa en un hospedante de expresión adecuado;
- un vector de expresión recombinante que comprende tal constructo de ácido nucleico;
- una célula hospedante recombinante que comprende tal vector de expresión;
- 20 - un método para producir una asparaginasa que comprende cultivar tal célula hospedante en condiciones que conduzcan a la producción de la asparaginasa, y recuperar la asparaginasa;
- un método para producir una variante de polipéptido de asparaginasa, método el cual comprende:
 - a) seleccionar un polipéptido de asparaginasa progenitor que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID NO: 3;
 - 25 b) sustituir al menos un resto de aminoácido que corresponde a cualquiera de 53, 63, 66 u 88, definiéndose dichas posiciones con referencia a SEC ID NO: 3;
 - c) sustituir opcionalmente uno o más aminoácidos adicionales como se definen en b);
 - d) preparar la variante que resulta de las etapas a)-c), en el que la variante tiene al menos 80% de identidad con SEC ID NO: 3;
 - 30 e) determinar la actividad específica y/o el óptimo de pH de la variante; y
 - f) seleccionar una variante que tiene una mayor actividad específica y/u óptimo de pH en comparación con el polipéptido de asparaginasa progenitor, para producir de ese modo una variante de polipéptido de asparaginasa.
- una composición que comprende una variante de la invención o una variante obtenida mediante un método de la invención;
- 35 - uso de una composición de la invención en la producción de un producto alimentario; y
- uso de una composición de la invención para reducir la cantidad de acrilamida formada en un producto alimentario térmicamente procesado basado en una materia prima que contiene asparagina.

Descripción detallada de la invención

40 A lo largo de la presente memoria descriptiva y de las reivindicaciones que se acompañan, las palabras "comprender" e "incluir", y variaciones tales como "comprende", "que comprende", "incluye" y "que incluye", se han de interpretar inclusivamente. Esto es, estas palabras están destinadas a verbalizar la posible inclusión de otros elementos o entidades completas no citadas específicamente, cuando lo permita el contexto.

45 La presente invención se refiere a una variante polipeptídica de un polipéptido progenitor que tiene actividad de asparaginasa. La variante tiene una secuencia de aminoácidos que, cuando se alinea con la secuencia expuesta en SEC ID NO: 3, comprende una sustitución de un resto de aminoácido que corresponde a cualquiera de los aminoácidos 53, 63, 66 u 88, definiéndose dichas posiciones con referencia a SEC ID NO: 3.

Es decir, cuando la secuencia de la asparaginasa variante se alinea con la secuencia de la asparaginasa de SEC ID

NO: 3, la variante comprenderá al menos una sustitución en una posición (en la variante) que corresponde a una de las posiciones expuestas anteriormente en SEC ID NO: 3. Una "sustitución", en este contexto, indica que una posición en la variante que corresponde a una de las posiciones expuestas anteriormente en SEC ID NO: 3 comprende un resto de aminoácido que no aparece en esa posición en el polipéptido progenitor (polipéptido progenitor el cual puede ser SEC ID NO: 3).

Esas posiciones en un polipéptido de asparaginasa variante de la invención, que corresponden a las posiciones expuestas anteriormente en SEC ID NO: 3, se puede identificar alineando la secuencia del polipéptido variante con la de SEC ID NO: 3 usando, por ejemplo, el alineamiento de GAP hasta la secuencia más homóloga encontrada por el programa GAP (véase más abajo para detalles de este programa). Las posiciones en la variante que corresponden a las posiciones en SEC ID NO: 3 como se exponen anteriormente se pueden de este modo identificar y se denominan como aquellas posiciones definidas con referencia a SEC ID NO: 3.

El polipéptido de asparaginasa progenitor que se puede usar en la presente invención puede ser cualquier asparaginasa (EC 3.5.1.1). Un polipéptido de asparaginasa adecuado se puede obtener a partir de diversas fuentes, tales como, por ejemplo, de una planta, un animal o un microorganismo. Por ejemplo, una asparaginasa se puede obtener de las especies *Escherichia*, *Erwinia*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Aspergillus* y *Bacillus*. Un ejemplo de una cepa de *Escherichia* adecuada es *Escherichia coli*. Un ejemplo de una cepa de *Erwinia* adecuada es *Erwinia chrysanthemi*. Los ejemplos de cepas de *Streptomyces* adecuadas son *Streptomyces lividans* y *Streptomyces murinus*. Los ejemplos de cepas de *Aspergillus* adecuadas son *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus niger*. Los ejemplos de cepas de *Bacillus* adecuadas son *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* o *Bacillus thuringiensis*.

Un ejemplo de métodos adecuados para obtener asparaginasa a partir de las cepas de *Bacillus*, *Streptomyces*, *Escherichia* o *Pseudomonas* se describe en el documento WO 03/083043. En los documentos WO 2004/030468 y WO 04/032468 se describe un ejemplo de métodos adecuados para obtener asparaginasa a partir de *Aspergillus*.

Un polipéptido de asparaginasa progenitor preferido, adecuado para uso en la invención, es el polipéptido que tiene la secuencia expuesta en SEC ID NO: 3 o que tiene al menos 80% de homología con SEC ID NO: 3, por ejemplo al menos 85% de homología con SEC ID NO: 3, tal como al menos 85% de homología con SEC ID NO: 3, tal como al menos 90% de homología con SEC ID NO: 3, por ejemplo al menos 95%, al menos 98%, o al menos 99% de homología con SEC ID NO: 3.

Los restos de aminoácidos en una variante de la invención que están sustituidos en comparación con la secuencia expuesta en SEC ID NO: 3 son aquellos que corresponden a las posiciones 53,63, 66 u 88, como se define en relación a la secuencia de SEC ID NO: 3.

Una variante puede comprender una sustitución en una o más de las mencionadas posiciones, por ejemplo en dos, tres o en todas las mencionadas posiciones.

Un subconjunto preferido de posiciones para sustitución se define por aquellas en las posiciones 63 u 88 como se define en relación a la secuencia de SEC ID NO: 3.

Una variante puede comprender una sustitución en una o más de las mencionadas posiciones, por ejemplo en dos de las mencionadas posiciones.

Una variante de la invención comprende una o más sustituciones como se define anteriormente. Una "sustitución", en este contexto, indica que una posición en la variante que corresponde a una de las posiciones expuestas anteriormente en SEC ID NO: 3 comprende un resto de aminoácido que no aparece en esa posición en el polipéptido progenitor (el progenitor puede ser SEC ID NO: 3).

En la siguiente Tabla se exponen sustituciones preferidas (definiéndose las posiciones con relación a la secuencia expuesta en SEC ID NO: 3).

Posición	La más preferida	Más preferida	Preferida
41	I		IN
53	Y		LY
62		GAT	GATFK
63	GVS	GASV	GASIVE
64	P		ANDP
66	P		NKP

ES 2 524 343 T3

Posición	La más preferida	Más preferida	Preferida
70		AS	
71		N	ASNE
73	K	QNKE	HSNDQERK
74	A		AV
76	T	STV	STVQNKE
77	I	IL	
88	YP	YPE	
90	V		VYF
91	E		SNE
101	V		VSTDH
102	S		SRK
103		I	LIFMT
104		ND	AND
106	P	PQ	GAKESTNPQ
107		N	SNE
108		VM	VML
109		NS	RDGNS
111	G	GS	GSTH
119	N	TN	TNMQER
122	H	EH	ADEHK
123	A		ALT
132	S		
140	N		
142		M	
143		D	DSAG
145	S	S	
161	L	VL	VLFM
162		T	AT
163		A	
164		S	GS
168		A	AGT
169		S	AGS
170	T	ST	EGST
195	D		

ES 2 524 343 T3

Posición	La más preferida	Más preferida	Preferida
211	S	SV	SVMINQ
213		S	SIM
214		H	SH
215		ST	
216		ST	STVLF
217		SN	ASNDK
218	V	VLT	
219		NQE	ASNQE
220		AS	
228	H	NH	ASNH
232	V	VI	VIF
233	V	VH	VHLREYFS
234		ND	GND
235		GS	GSDI
262	CH		
267	Y	Y	
268		NAG	GANTF
269		HF	
270		Q	ASIQ
271		N	NE
272		A	AIDQ
273		QTS	QTSPDE
293	SV	SVET	SVETML
295	S	NS	
297	S	NSTA	
298		ILM	ILMWFT
299	S	SDA	SDAPHYN
300	I	SI	EDHKANQIS
301	P	TPAGD	GATPNRDEYK
302		Y	QNHWWIY
303	S	YFS	GLKEDIAYFS
304	T	ATSD	ATSDNKP
310	V	ATV	AVMT
314	D	SND	GASNDQH

ES 2 524 343 T3

Posición	La más preferida	Más preferida	Preferida
317	I	I	
318		MIA	
319		ATLR	ATLRVIYH
321	T	ST	STHRKA
323		VS	IVS
324	G	GP	MAGP
325		AST	ASTDEW
327		M	MIPYSARVT
328		ST	STI
329		AT	ATLG
330	S	PSYTIL	DERQVPSYTIL
331		AT	ATGNDEKR
332	A	A	ANSGEKPQ
333	E	EDS	EDSIFAGK
334		GTDE	GTDEPVI
335		TGD	
371	M		AIM

Una variante según la invención puede tener una secuencia de aminoácidos que, cuando se alinea con la secuencia expuesta en SEC ID NO: 3, comprende uno o más de Tyr en la posición 53, Gly o Val o Ser en la posición 63, Pro en la posición 66, Tyr o Pro en la posición 88, definiéndose dichas posiciones con respecto a SEC ID NO: 3.

- 5 En una realización preferida, una variante según la invención puede tener una secuencia de aminoácidos que, cuando se alinea con la secuencia expuesta en SEC ID NO: 3, comprende uno o más de Gly o Val en la posición 63, Tyr o Pro en la posición 88, definiéndose dichas posiciones con respecto a SEC ID NO: 3.

- 10 En una realización preferida, una variante según la invención puede tener una secuencia de aminoácidos que, cuando se alinea con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 3, comprende al menos una sustitución de un resto de aminoácido que corresponde al aminoácido 63, preferiblemente que comprende un Gly o Val en la posición 63, definiéndose dichas posiciones con referencia a SEQ ID NO: 3, y en la que el polipéptido progenitor de dicha variante corresponde preferiblemente a SEQ ID NO: 3.

- 15 Un ejemplo de una variante de un polipéptido progenitor que tiene actividad de asparaginasa, en el que la variante tiene una secuencia de aminoácidos que, cuando se alinea con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 3, comprende al menos una sustitución de un resto de aminoácido que corresponde al aminoácido 63, definiéndose dichas posiciones con referencia a SEQ ID NO: 3, y en el que el polipéptido progenitor corresponde a SEQ ID NO: 3, es el polipéptido que comprende las sustituciones D63G y G132S (provisionalmente denominado ASN01), comprendiendo el polipéptido las sustituciones D63G, D111G y R122H (provisionalmente denominado ASN02), comprendiendo el polipéptido las sustituciones D63V y T3001 (provisionalmente denominado ASN03).

- 20 Una variante puede tener una secuencia de aminoácidos que, cuando se alinea con la secuencia expuesta en SEC ID NO: 3, comprende al menos una sustitución de un resto de aminoácido que corresponde al aminoácido 64, preferiblemente que comprende una Pro en la posición 64, definiéndose dichas posiciones con referencia a SEC ID NO: 3, y en el que el polipéptido progenitor de dicha variante corresponde preferiblemente a SEC ID NO: 3.

- 25 Un ejemplo de una variante de un polipéptido progenitor que tiene actividad de asparaginasa, en el que la variante tiene una secuencia de aminoácidos que, cuando se alinea con la secuencia expuesta en SEC ID NO: 3, comprende al menos una sustitución de un resto de aminoácido que corresponde al aminoácido 64, definiéndose dichas

posiciones con referencia a SEC ID NO: 3, y en el que el polipéptido progenitor corresponde a SEC ID NO: 3, es el polipéptido que comprende las sustituciones S64P y I310V (provisionalmente denominado ASN04).

5 En todavía otra realización, una variante según la invención puede tener una secuencia de aminoácidos que, cuando se alinea con la secuencia expuesta en SEC ID NO: 3, comprende al menos una sustitución de un resto de aminoácido que corresponde al aminoácido 66, preferiblemente que comprende un Pro en la posición 66, definiéndose dichas posiciones con referencia a SEC ID NO: 3, y en el que el polipéptido progenitor de dicha variante corresponde preferiblemente a SEC ID NO: 3.

10 Un ejemplo de una variante de un polipéptido progenitor que tiene actividad de asparaginasa, en el que la variante tiene una secuencia de aminoácidos que, cuando se alinea con la secuencia expuesta en SEC ID NO: 3, comprende al menos una sustitución de un resto de aminoácido que corresponde al aminoácido 66, definiéndose dichas posiciones con referencia a SEC ID NO: 3, y en el que el polipéptido progenitor corresponde a SEC ID NO: 3, es el polipéptido que comprende las sustituciones T41I, S66P y V371M (provisionalmente denominado ASN05).

15 Una variante puede tener una secuencia de aminoácidos que, cuando se alinea con la secuencia expuesta en SEC ID NO: 3, comprende al menos una sustitución de un resto de aminoácido que corresponde al aminoácido 73, 74, 293, preferiblemente que comprende uno o más de Lys en la posición 73, Ala en la posición 74, Ser o Val en la posición 293 definiéndose dichas posiciones con referencia a SEC ID NO: 3, y en el que el polipéptido progenitor de dicha variante corresponde preferiblemente a SEC ID NO: 3.

20 Ejemplos de una variante de un polipéptido progenitor que tiene actividad de asparaginasa, en el que la variante tiene una secuencia de aminoácidos que, cuando se alinea con la secuencia expuesta en SEC ID NO: 3, comprende al menos una sustitución de un resto de aminoácido que corresponde al aminoácido 73, 74 ó 293, definiéndose dichas posiciones con referencia a SEC ID NO: 3, y en el que el polipéptido progenitor corresponde a SEC ID NO: 3, son el polipéptido que comprende las sustituciones G195D y A293V (provisionalmente denominado ASN14), el polipéptido que comprende las sustituciones T73K; S74A; y A293S (provisionalmente denominado ASN15) o el polipéptido que comprende las sustituciones T73K, S74A, E106P, A293S, G297S, T299S, Q319A, M321T, y V324G (provisionalmente denominado ASN16).

25 Una variante puede tener una secuencia de aminoácidos que, cuando se alinea con la secuencia expuesta en SEC ID NO: 3, comprende al menos una sustitución de un resto de aminoácido que corresponde al aminoácido 76 ó 101, preferiblemente que comprende uno o más de Thr en la posición 76, o Val en la posición 101 definiéndose dichas posiciones con referencia a SEC ID NO: 3, y en el que el polipéptido progenitor de dicha variante corresponde preferiblemente a SEC ID NO: 3.

30 Un ejemplo de una variante de un polipéptido progenitor que tiene actividad de asparaginasa, en el que la variante tiene una secuencia de aminoácidos que, cuando se alinea con la secuencia expuesta en SEC ID NO: 3, comprende al menos una sustitución de un resto de aminoácido que corresponde al aminoácido 76 ó 101, definiéndose dichas posiciones con referencia a SEC ID NO: 3, y en el que el polipéptido progenitor corresponde a SEC ID NO: 3, es el polipéptido que comprende las sustituciones A76T y A101V (provisionalmente denominado ASN06).

35 Una variante puede tener una secuencia de aminoácidos que, cuando se alinea con la secuencia expuesta en SEC ID NO: 3, comprende al menos una sustitución de un resto de aminoácido que corresponde al aminoácido 77, preferiblemente que comprende Ile en la posición 77, definiéndose dichas posiciones con referencia a SEC ID NO: 3, y en el que el polipéptido progenitor de dicha variante corresponde preferiblemente a SEC ID NO: 3.

40 Un ejemplo de una variante de un polipéptido progenitor que tiene actividad de asparaginasa, en el que la variante tiene una secuencia de aminoácidos que, cuando se alinea con la secuencia expuesta en SEC ID NO: 3, comprende al menos una sustitución de un resto de aminoácido que corresponde al aminoácido 77, definiéndose dichas posiciones con referencia a SEC ID NO: 3, y en el que el polipéptido progenitor corresponde a SEC ID NO: 3, es el polipéptido que comprende las sustituciones V77I, V123A y E314D (provisionalmente denominado ASN07).

45 En una realización, una variante según la invención puede tener una secuencia de aminoácidos que, cuando se alinea con la secuencia expuesta en SEC ID NO: 3, comprende al menos una sustitución de un resto de aminoácido que corresponde al aminoácido 88, preferiblemente que comprende un Tyr o Pro en la posición 88, definiéndose dichas posiciones con referencia a SEC ID NO: 3, y en el que el polipéptido progenitor de dicha variante corresponde preferiblemente a SEC ID NO: 3.

50 Un ejemplo de una variante de un polipéptido progenitor que tiene actividad de asparaginasa, en el que la variante tiene una secuencia de aminoácidos que, cuando se alinea con la secuencia expuesta en SEC ID NO: 3, comprende al menos una sustitución de un resto de aminoácido que corresponde al aminoácido 88, definiéndose dichas posiciones con referencia a SEC ID NO: 3, y en el que el polipéptido progenitor corresponde a SEC ID NO: 3, es el polipéptido que comprende la sustitución S88Y (provisionalmente denominado ASN08) o el polipéptido que comprende las sustituciones S88P, I161L y R262C (provisionalmente denominado ASN09).

55 Una variante puede tener una secuencia de aminoácidos que, cuando se alinea con la secuencia expuesta en SEC ID NO: 3, comprende al menos una sustitución de un resto de aminoácido que corresponde al aminoácido 140,

preferiblemente que comprende un Asn en la posición 140, definiéndose dichas posiciones con referencia a SEC ID NO: 3, y en el que el polipéptido progenitor de dicha variante corresponde preferiblemente a SEC ID NO: 3.

5 Un ejemplo de una variante de un polipéptido progenitor que tiene actividad de asparaginasa, en el que la variante tiene una secuencia de aminoácidos que, cuando se alinea con la secuencia expuesta en SEC ID NO: 3, comprende al menos una sustitución de un resto de aminoácido que corresponde al aminoácido 140, definiéndose dichas posiciones con referencia a SEC ID NO: 3, y en el que el polipéptido progenitor corresponde a SEC ID NO: 3, es el polipéptido que comprende la sustitución D140N (provisionalmente denominado ASN10).

10 Una variante puede tener una secuencia de aminoácidos que, cuando se alinea con la secuencia expuesta en SEC ID NO: 3, comprende al menos una sustitución de un resto de aminoácido que corresponde al aminoácido 170, preferiblemente que comprende un Thr en la posición 170, definiéndose dichas posiciones con referencia a SEC ID NO: 3, y en el que el polipéptido progenitor de dicha variante corresponde preferiblemente a SEC ID NO: 3.

15 Un ejemplo de una variante de un polipéptido progenitor que tiene actividad de asparaginasa, en el que la variante tiene una secuencia de aminoácidos que, cuando se alinea con la secuencia expuesta en SEC ID NO: 3, comprende al menos una sustitución de un resto de aminoácido que corresponde al aminoácido 170, definiéndose dichas posiciones con referencia a SEC ID NO: 3, y en el que el polipéptido progenitor corresponde a SEC ID NO: 3, es el polipéptido que comprende las sustituciones D91E, A170T y R262H (provisionalmente denominado ASN11).

20 En una realización más, una variante según la invención puede tener una secuencia de aminoácidos que, cuando se alinea con la secuencia expuesta en SEC ID NO: 3, comprende al menos una sustitución de un resto de aminoácido que corresponde al aminoácido 53, preferiblemente que comprende un Tyr en la posición 53, definiéndose dichas posiciones con referencia a SEC ID NO: 3, y en el que el polipéptido progenitor de dicha variante corresponde preferiblemente a SEC ID NO: 3.

25 Ejemplos de una variante de un polipéptido progenitor que tiene actividad de asparaginasa, en el que la variante tiene una secuencia de aminoácidos que, cuando se alinea con la secuencia expuesta en SEC ID NO: 3, comprende al menos una sustitución de un resto de aminoácido que corresponde al aminoácido 53, definiéndose dichas posiciones con referencia a SEC ID NO: 3, y en el que el polipéptido progenitor corresponde a SEC ID NO: 3, es el polipéptido que comprende las sustituciones F53Y y K119N (provisionalmente denominado ASN13).

30 Un ejemplo adicional de una variante de un polipéptido progenitor que tiene actividad de asparaginasa, en el que la variante tiene una secuencia de aminoácidos que, cuando se alinea con la secuencia expuesta en SEC ID NO: 3, comprende la sustitución de un aminoácido que corresponde al aminoácidos 90, 119, 228, y 262, definiéndose dichas posiciones con referencia a SEC ID NO: 3, y en el que el polipéptido progenitor corresponde a SEC ID NO: 3, es el polipéptido que comprende las sustituciones L90V, K119N, Y228H, y R262C (provisionalmente denominado ASN12).

35 Una variante de la invención también puede comprender modificaciones adicionales en comparación con el progenitor en posiciones distintas de las especificadas anteriormente, por ejemplo una o más sustituciones, adiciones o supresiones adicionales. Una variante de la invención puede comprender una combinación de diferentes tipos de modificación de esta clase. Una variante puede comprender una, dos, tres, cuatro, al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30 o más de tales modificaciones (que pueden ser todas del mismo tipo, o pueden ser diferentes tipos de modificación). Típicamente, las modificaciones adicionales pueden ser sustituciones.

40 Una variante según la invención tiene al menos 80% de homología con el polipéptido de asparaginasa progenitor, por ejemplo al menos 85% de homología con el polipéptido progenitor, tal como 90% de homología con el polipéptido progenitor, al menos 95% de homología con el polipéptido progenitor, al menos 98% de homología con el polipéptido progenitor, o al menos 99% de homología con el polipéptido progenitor.

45 Una variante de la invención retendrá típicamente actividad de asparaginasa (EC 3.5.1.1). Es decir, una variante de la invención será capaz típicamente de catalizar la hidrólisis de asparagina a ácido aspártico. Una variante de la invención es, por lo tanto, aquella que es típicamente capaz de modificar las cadenas laterales de asparaginasa que están implicadas en la formación de acrilamida durante la producción de un producto alimentario que implica al menos una etapa de calentamiento.

50 Preferiblemente, una variante de la invención mostrará típicamente propiedades mejoradas en comparación con el polipéptido de asparaginasa progenitor del que deriva. Tal propiedad mejorada será típicamente una que es relevante si la variante se fuera a usar como se expone más abajo, por ejemplo en un método para preparar un producto alimentario.

55 Tales propiedades incluyen, pero no se limitan a, mayor actividad específica (de manera que puede ser posible usar una menor cantidad de la variante en un método para la preparación de un producto alimentario en comparación con la cantidad de asparaginasa progenitora requerida), un mayor o menor óptimo de pH, más particularmente un óptimo de pH más adecuado para uso en un método para la preparación de un producto alimentario (en comparación con la asparaginasa progenitora), y mayor estabilidad.

Una variante de polipéptido de asparaginasa según la invención tiene al menos 80% de identidad con la secuencia polipeptídica como se expone en SEC ID NO: 3, que, cuando se alinea con la secuencia expuesta en SEC ID NO: 3, comprende al menos una sustitución de un resto de aminoácido que corresponde a cualquiera de los aminoácidos 53, 63, 66, u 88, definiéndose dichas posiciones con referencia a SEC ID NO: 3; y en el que la variante tiene una actividad específica que es mayor a al menos un pH que la del polipéptido como se expone en SEC ID NO: 3 medida al mismo pH, y/o en el que la variante tiene un óptimo de pH que es mayor que el del polipéptido como se expone en SEC ID NO: 3.

En una realización, una proteína variante según la invención puede tener un óptimo de pH que es mayor que el del polipéptido progenitor, o menor que el del polipéptido progenitor. Preferiblemente, el óptimo de pH de la proteína variante es mayor que el del polipéptido progenitor. El polipéptido progenitor es aquel según SEC ID NO: 3. La asparaginasa de tipo salvaje de *A. niger* (como se describe en SEC ID NO: 3) tiene un óptimo de pH de pH 4 a pH 5. Una proteína variante de la invención puede ser más alcalifílica que tal enzima de tipo salvaje, es decir, por ejemplo, puede tener un óptimo de pH de pH 5 a pH 8, preferiblemente de pH 6 a pH 7.

Preferiblemente, una proteína asparaginasa variante según la invención puede tener un pH que es mayor que el óptimo de pH y en el cual el 50% de la actividad de asparaginasa todavía está presente, (en lo sucesivo indicado como pH alcalino), que es mayor que el de la asparaginasa progenitora según SEC ID NO: 3. La proteína variante puede tener un pH alcalino al que se observa 50% de la actividad, que es al menos 6,9, preferiblemente al menos 7,0, al menos 7,5, preferiblemente al menos 8.

Una variante que muestra una propiedad que está mejorada en relación con la asparaginasa progenitora es aquella que demuestra una reducción o incremento medible en la propiedad relevante, típicamente de manera que la variante es más adecuada para uso como se expone más abajo, por ejemplo en un método para la producción de un producto alimentario.

Preferiblemente, una proteína variante según la invención puede tener una actividad específica que es mayor que la del polipéptido progenitor medida al mismo pH. Por actividad específica de una proteína variante se quiere decir aquí la actividad de asparaginasa de la proteína variante medida en unidades/mg de proteína pura. Preferiblemente, la actividad específica de la proteína variante según la invención es mayor a al menos un pH, preferiblemente un pH entre 4 y 8, que la del polipéptido progenitor medida al mismo pH.

La asparaginasa variante puede ser más termófila que el polipéptido de asparaginasa progenitor.

La propiedad se puede disminuir de este modo en al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40% al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 99%. Como alternativa, la propiedad se puede incrementar en al menos 10%, al menos 25%, al menos 50%, al menos 100%, al menos, 200%, al menos 500% o al menos 1000%. El porcentaje de disminución o incremento, en este contexto, representa el porcentaje de disminución o incremento en comparación con el polipéptido de asparaginasa progenitor. Es bien conocido por la persona experta cómo se pueden medir tales cambios de porcentaje – es una comparación de la actividad de la asparaginasa progenitora y la asparaginasa variante.

Las variantes descritas aquí están comprendidas colectivamente en las expresiones “un polipéptido según la invención” o “una variante de la invención”.

Los términos “péptido” y “oligopéptido” se consideran sinónimos (como se reconoce normalmente), y cada término se puede usar de forma intercambiable según lo requiera el contexto para indicar una cadena de al menos dos aminoácidos acoplados mediante enlaces peptídicos. La palabra “polipéptido” se usa aquí para cadenas que contienen más de siete restos de aminoácidos. Todas las fórmulas o secuencias oligopeptídicas y polipeptídicas aquí están escritas de izquierda a derecha y en la dirección desde el término amino al término carboxi. Habitualmente se conoce en la técnica el código de una letra de aminoácidos usado aquí, y se puede encontrar en Sambrook, et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

Por polipéptido o proteína “aislado” se quiere decir un polipéptido o proteína retirado de su entorno nativo. Por ejemplo, los polipéptidos y proteínas producidos recombinantemente expresados en células hospedantes se consideran aislados para el fin de la invención ya que son polipéptidos recombinantes que se han purificado sustancialmente mediante cualquier técnica adecuada, tal como, por ejemplo, el método de purificación de una sola etapa descrito en Smith y Johnson, Gene 67:31-40 (1988).

Una variante de polipéptido según la invención se puede recuperar y purificar a partir de cultivos de células recombinantes mediante métodos conocidos en la técnica. Lo más preferible, para la purificación se emplea cromatografía de líquidos de altas prestaciones (“HPLC”).

Los polipéptidos de la presente invención incluyen productos de procedimientos sintéticos químicos, y productos producidos mediante técnicas recombinantes de un hospedante procarionota o eucarionota, que incluye, por ejemplo, células bacterianas, de levadura, de plantas superiores, de insectos y de mamíferos. Dependiendo del hospedante empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos de la presente invención se pueden

glicosilar o se pueden no glicosilar. Además, los polipéptidos de la invención también pueden incluir un resto de metionina modificado inicial, en algunos casos como resultado de los procesos mediados por el hospedante.

La invención también se refiere a fragmentos biológicamente activos de las variantes de polipéptidos según la invención. Se considera que tales fragmentos están englobados en la expresión "una variante de la invención".

5 Los fragmentos biológicamente activos de una variante de polipéptido de la invención incluyen polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente idénticas a o derivadas de la secuencia de aminoácidos de una proteína variante de la invención, que incluye un menor número de aminoácidos que la proteína de longitud completa pero que muestra al menos una actividad biológica de la proteína de longitud completa correspondiente. Típicamente, los fragmentos biológicamente activos comprenden un dominio o motivo con al menos una actividad de una proteína variante de la invención. Un fragmento biológicamente activo de una proteína de la invención puede ser un polipéptido que tiene, por ejemplo, una longitud de 10, 25, 50, 100 o más aminoácidos. Además, se pueden preparar mediante técnicas recombinantes otras porciones biológicamente activas, en las que están suprimidas otras regiones de la proteína, y se pueden evaluar en busca de una o más de las actividades biológicas de la forma nativa de un polipéptido de la invención.

15 Típicamente, un fragmento proteico de la invención comprenderá una o más de las sustituciones definidas aquí.

La invención también se refiere a fragmentos de ácidos nucleicos que codifican los fragmentos biológicamente activos anteriores (fragmentos biológicamente activos los cuales son ellos mismos variantes de la invención).

20 Como se expone anteriormente, la presente invención proporciona polinucleótidos que codifican los polipéptidos variantes de la invención. La invención también se refiere a un polinucleótido aislado que codifica al menos un dominio funcional de una variante de polipéptido de la invención. Típicamente, tal dominio comprenderá una o más de las sustituciones descritas aquí.

25 En una realización de la invención, la secuencia de ácido nucleico según la invención codifica un polipéptido, en el que el polipéptido es una variante que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene uno o más truncamientos, y/o al menos una sustitución, supresión y/o inserción de un aminoácido en comparación con la asparaginasa progenitora. Tal polipéptido, sin embargo, comprenderá típicamente una o más de las sustituciones descritas aquí.

30 Como se usan aquí, los términos "gen" y "gen recombinante" se refieren a moléculas de ácidos nucleicos que incluyen un marco de lectura abierto que codifica una variante como se describe aquí. Un gen puede incluir secuencias codificantes, secuencias no codificantes, intrones y secuencias reguladoras. Es decir, un "gen", como se usa aquí, se puede referir a una molécula de ácido nucleico aislada como se define aquí. En consecuencia, el término "gen", en el contexto de la presente solicitud, no se refiere solamente a secuencias de origen natural.

Una molécula de ácido nucleico de la presente invención se puede generar usando técnicas de biología molecular estándar, bien conocidas por aquellos expertos en la técnica, tomadas en combinación con la información de secuencias proporcionada aquí.

35 Por ejemplo, usando técnicas sintéticas estándar, la molécula de ácido nucleico requerida se puede sintetizar *de novo*. Tal procedimiento sintético será típicamente un procedimiento automatizado.

40 Como alternativa, una molécula de ácido nucleico de la invención se puede generar mediante uso de mutagénesis dirigida al sitio de una molécula de ácido nucleico existente, por ejemplo una molécula de ácido nucleico de tipo salvaje. La mutagénesis dirigida al sitio se puede llevar a cabo usando un número de técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica.

45 En uno de tales métodos, mencionado aquí simplemente a título de ejemplo, la PCR se lleva a cabo en un molde plasmídico usando "cebadores" oligonucleotídicos que codifican la sustitución deseada. Puesto que los cebadores son los extremos de hebras nuevamente sintetizadas, en caso de que exista un desemparejamiento durante el primer ciclo en la unión de la hebra de ADN molde, después de esa primera ronda, la hebra basada en el cebador (que contiene la mutación) estaría en igual concentración al molde original. Después de ciclos sucesivos, crecería exponencialmente, y después de 25, superaría a la hebra original no mutada, en la región de 8 millones:1, dando como resultado una solución casi homogénea de fragmentos amplificados mutados. El ADN molde se puede eliminar entonces mediante digestión enzimática usando por ejemplo una enzima de restricción que escinde solamente ADN metilado, tal como Dpn1. El molde, que deriva de una preparación plasmídica de lisis alcalina, y por lo tanto está metilado, es destruido en esta etapa, pero el plásmido mutado se conserva debido a que se generó *in vitro* y como resultado no está metilado.

55 En tal método, se puede introducir más de una mutación (que codifica una sustitución como se describe aquí) en una molécula de ácido nucleico en una única reacción de PCR, por ejemplo usando uno o más oligonucleótidos, comprendiendo cada uno uno o más desemparejamientos. Como alternativa, se puede introducir más de una mutación en una molécula de ácido nucleico al llevar a cabo más de una reacción de PCR, introduciendo cada reacción una o más mutaciones, de manera que se introducen en el ácido nucleico, de manera secuencial e

iterativa, ácidos nucleicos alterados.

5 Un ácido nucleico de la invención se puede generar usando ADNc, ARNm, o, como alternativa, ADN genómico, como molde y cebadores oligonucleotídicos desemparejados apropiados según la técnica de mutagénesis dirigida al sitio descrita anteriormente. Una molécula de ácido nucleico obtenida de esta manera se puede clonar en un vector apropiado y se puede caracterizar mediante análisis de secuencia de ADN.

Una secuencia de ácido nucleico de la invención puede comprender una o más supresiones, es decir, saltos, en comparación con la asparaginasa progenitora. Tales supresiones/saltos también se pueden generar usando mutagénesis dirigida al sitio usando oligonucleótidos apropiados. Las técnicas para generar tales supresiones son bien conocidas por los expertos en la técnica.

10 Además, los oligonucleótidos que corresponden a o son hibridables a secuencias nucleotídicas según la invención se pueden preparar mediante técnicas sintéticas estándar, por ejemplo usando un sintetizador de ADN automatizado.

15 También, en la presente invención se incluyen moléculas de ácidos nucleicos complementarias. Una molécula de ácido nucleico que es complementaria a otra secuencia de ácido nucleico es aquella que es suficientemente complementaria a la otra secuencia nucleotídica, de forma que se puede hibridar a la otra secuencia nucleotídica formando de ese modo un dúplex estable.

20 Un aspecto de la invención se refiere a moléculas de ácidos nucleicos aisladas que codifican una variante de la invención o un fragmento o dominio biológicamente activo. Las moléculas de ácidos nucleicos se pueden usar como sondas de hibridación para identificar moléculas de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de la invención y fragmentos de tales moléculas de ácidos nucleicos, adecuados para uso como cebadores de la PCR para la amplificación o mutación de moléculas de ácidos nucleicos, tales como para la preparación de moléculas de ácidos nucleicos de la invención.

25 Un "polinucleótido aislado" o "ácido nucleico aislado" es un ADN o ARN que no está inmediatamente contiguo a ambas secuencias codificantes con las que está inmediatamente contiguo (una en el extremo 5' y una en el extremo 3') en el genoma de origen natural del organismo a partir del que deriva. De este modo, en una realización, un ácido nucleico aislado incluye algunas o todas las secuencias no codificantes de 5' (por ejemplo, promotoras) que están inmediatamente contiguas a la secuencia codificante. Por lo tanto, el término incluye, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora en un vector, en un plásmido o virus que se replica autónomamente, o en el ADN genómico de una procarionota o eucarionota, o que existe como molécula separada (por ejemplo, un ADNc o un fragmento de ADN genómico producido mediante PCR o tratamiento con endonucleasas de restricción) independiente de otras secuencias. También incluye un ADN recombinante que es parte de un gen híbrido que codifica un polipéptido adicional que está sustancialmente libre de material celular, material vírico, o medio de cultivo (cuando se produce mediante técnicas de ADN recombinante), o precursores víricos u otras sustancias químicas (cuando se sintetiza químicamente). Además, un "fragmento de ácido nucleico aislado" es un fragmento de ácido nucleico que no es de origen natural como fragmento, y que no se encontraría en el estado natural.

35 Como se usa aquí, los términos "polinucleótido" o "molécula de ácido nucleico" están destinados a incluir moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) y moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm), y análogos del ADN o ARN generados usando análogos nucleotídicos. La molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferiblemente es ADN bicatenario. El ácido nucleico se puede sintetizar usando análogos o derivados oligonucleotídicos (por ejemplo, inosina o nucleótidos de fosforotioato). Tales oligonucleótidos se pueden usar, por ejemplo, para preparar ácidos nucleicos que tienen capacidades alteradas de emparejamiento de bases, o que tienen resistencia incrementada a nucleasas.

40 Los términos "homología" o "porcentaje de identidad" se usan aquí de forma intercambiable. Para los fines de esta invención, se define aquí que, a fin de determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácidos nucleicos, las secuencias se alinean con fines de comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir saltos en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos para el alineamiento óptimo con una segunda secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos). Entonces se comparan los restos de aminoácidos o nucleotídicos en las posiciones de los aminoácidos o nucleotídicos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo resto de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = número de posiciones idénticas/número total de posiciones (es decir, posiciones que solapan) x 100). Preferiblemente, las dos secuencias tienen la misma longitud.

55 Se puede llevar a cabo una comparación de secuencias a lo largo de las longitudes completas de las dos secuencias que se comparan, o a lo largo del fragmento de las dos secuencias. Típicamente, la comparación se llevará a cabo a lo largo de toda la longitud de las dos secuencias que se comparan. Sin embargo, una identidad de secuencia se puede llevar a cabo a lo largo de una región de, por ejemplo, veinte, cincuenta, cien o más restos de aminoácidos contiguos.

La persona experta estará al tanto del hecho de que existen varios programas de ordenador diferentes para determinar la homología entre dos secuencias. Por ejemplo, se puede lograr una comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre las dos secuencias usando un algoritmo matemático. En una realización preferida, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos se determina usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. (48):444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.accelrys.com/products/gcg/>), usando una matriz Blossom 62 o una matriz PAM250, y un peso de salto de 16, 14, 12, 10, 8, 6, ó 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, ó 6. La persona experta apreciará que todos estos parámetros diferentes producirán resultados ligeramente diferentes, pero que el porcentaje global de identidad de las dos secuencias no se ve alterado significativamente cuando se usan algoritmos diferentes.

Las secuencias proteicas o de ácidos nucleicos de la presente invención se pueden usar además como una "secuencia de interrogación" para llevar a cabo una búsqueda frente a bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar otros miembros de la familia o secuencias relacionadas. Tales búsquedas se pueden llevar a cabo usando los programas BLASTN y BLASTP (versión 2.0) de Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Las búsquedas de proteínas de BLAST se pueden realizar con el programa BLASTP, puntuación = 50, longitud de la palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a moléculas proteicas de la invención. Para obtener alineamientos con saltos con fines de comparación, se puede utilizar Gapped BLAST, como se describe en Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden usar los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, BLASTP y BLASTN). Véase la página del National Center for Biotechnology Information en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Otro aspecto de la invención se refiere a vectores, preferiblemente vectores de expresión, que contienen un ácido nucleico que codifica una asparaginasa variante de la invención.

Como se usa aquí, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual éste se ha ligado. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el cual se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en el que los segmentos de ADN adicionales se pueden ligar en el genoma vírico. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedante en la que se han introducido (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación, y vectores de mamíferos episómicos). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamíferos no episómicos) se integran en el genoma de una célula hospedante con la introducción en la célula hospedante, y de ese modo se replican junto con el genoma del hospedante. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes a los cuales están ligados operativamente. Tales vectores se denominan aquí como "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos. Los términos "plásmido" y "vector" se pueden usar intercambiamente aquí, puesto que el plásmido es la forma más comúnmente usada de vector. Sin embargo, la invención pretende incluir otras tales formas de vectores de expresión, tales como vectores víricos (por ejemplo, los retrovirus de replicación defectuosa, los adenovirus y los virus adenoasociados), que sirven funciones equivalentes.

Los vectores de expresión recombinantes de la invención comprenden un ácido nucleico de la invención en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula hospedante, lo que significa que el vector de expresión recombinante incluye una o más secuencias reguladoras, seleccionadas en base a las células hospedantes a usar para la expresión, que están enlazadas operativamente a la secuencia de ácido nucleico a expresar. En un vector de expresión recombinante, "enlazada operativamente" pretende decir que la secuencia nucleotídica de interés está enlazada a la secuencia o secuencias reguladoras de manera que permite la expresión de la secuencia nucleotídica (por ejemplo, en un sistema de transcripción/traducción in Vitro, o en una célula hospedante cuando el vector se introduce en la célula hospedante). La expresión "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señal de poliadenilación). Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Las secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia nucleotídica en muchos tipos de células hospedantes, y aquellas que dirigen la expresión de la secuencia nucleotídica solamente en una cierta célula hospedante (por ejemplo, secuencias reguladoras específicas de tejidos). Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedante a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Los vectores de expresión de la invención se pueden introducir en células hospedantes para producir de ese modo proteínas o péptidos, codificados por ácidos nucleicos como se describen aquí (la variante de asparaginasa de SEC ID NO:3, o una variante de la misma, por ejemplo un equivalente funcional o fragmento, o una proteína de fusión que comprende una o más de tales variantes).

Los vectores de expresión recombinantes de la invención se pueden diseñar para la expresión de proteínas variantes de la invención en células procariontas o eucariotas. Por ejemplo, una proteína variante de la invención se puede expresar en células bacterianas tales como E. coli, células de insectos (usando vectores de expresión de baculovirus), células de levadura o células de mamíferos. Las células hospedantes adecuadas se explican adicionalmente en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Como alternativa, el vector de expresión recombinante se puede transcribir y traducir in vitro, por ejemplo usando secuencias reguladoras del promotor T7 y la T7 polimerasa.

Los vectores de expresión útiles en la presente invención incluyen vectores derivados de cromosomas, de episomas y de virus, por ejemplo vectores derivados de plásmidos bacterianos, bacteriófago, episoma de levadura, elementos cromosómicos de levadura, virus tales como baculovirus, papovavirus, virus de la vacuna, adenovirus, virus de la viruela aviar, virus y retrovirus de la pseudorrabia, y vectores derivados de sus combinaciones, tales como aquellos derivados de elementos genéticos plasmídicos y bacteriofágicos, tales como cósmidos y fagómidos.

El inserto de ADN debería enlazarse operativamente a un promotor apropiado, tal como el promotor PL del fago lambda, los promotores lac, trp y tac de *E. coli*, los promotores temprano y tardío de SV40, y los promotores de las LTR retrovíticas, por nombrar unos pocos. Otros promotores adecuados serán conocidos por la persona experta. En una realización específica, se prefieren promotores que son capaces de dirigir un nivel elevado de expresión de asparaginasa en hongos filamentosos. Tales promotores son conocidos en la técnica. Los constructos de expresión pueden contener sitios para la iniciación de la transcripción, la terminación, y, en la región transcrita, un sitio de unión al ribosoma para la traducción. La porción codificante de los transcritos maduros expresados por los constructos incluirá al comienzo un AUG que inicia la traducción, y un codón de terminación apropiadamente colocado en el extremo del polipéptido a traducir.

El ADN del vector se puede introducir en células procariotas o eucariotas vía técnicas convencionales de transformación o transfección. Como se usa aquí, los términos "transformación" y "transfección" se refieren a una variedad de técnicas reconocidas en la técnica para introducir ácido nucleico extraño (por ejemplo, ADN) en una célula hospedante, incluyendo coprecipitación con fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transducción, infección, lipofección, transfección mediada por lípidos catiónicos, o electroporación. Los métodos adecuados para transformar o transfectar células hospedantes se pueden encontrar en Sambrook, et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989), Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology (1986), y otros manuales de laboratorio.

Para la transfección estable de células de mamíferos, se sabe que, dependiendo del vector de expresión y de la técnica de transfección usada, sólo una pequeña fracción de células puede integrar el ADN extraño en su genoma. A fin de identificar y seleccionar estos integrantes, se introduce generalmente en las células hospedantes un gen que codifica un marcador seleccionable (por ejemplo, resistencia a antibióticos) junto con el gen de interés. Los marcadores seleccionables preferidos incluyen aquellos que confieren resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina y metatrexato. El ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable se puede introducir en una célula hospedante en el mismo vector que aquel que codifica una proteína variante de la invención, o se puede introducir en un vector distinto. Las células transfectadas de forma estable con el ácido nucleico introducido se pueden identificar mediante selección con fármacos (por ejemplo, las células que han incorporado el gen del marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células morirán).

La expresión de proteínas en procariotas se lleva a cabo a menudo en *E. coli* con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de proteínas de fusión o proteínas no de fusión. Los vectores de fusión añaden un número de aminoácidos a una proteína codificada en ellos, por ejemplo al término amino de la proteína recombinante. Tales vectores de fusión sirven típicamente para tres fines: 1) para incrementar la expresión de proteína recombinante; 2) para incrementar la solubilidad de la proteína recombinante; y 3) para ayudar a la purificación de la proteína recombinante al actuar como un ligando en una purificación por afinidad. A menudo, en vectores de expresión de fusión, se introduce un sitio de escisión proteolítica en la unión del resto de fusión y la proteína recombinante, para permitir la separación de la proteína recombinante del resto de fusión tras la purificación de la proteína de fusión.

Como se indica, los vectores de expresión contendrán preferiblemente marcadores seleccionables. Tales marcadores incluirán dihidrofolato reductasa o resistencia a neomicina para el cultivo de células eucariotas, y resistencia a tetraciclina o a ampicilina para el cultivo en *E. coli* y otras bacterias. Los ejemplos representativos de hospedante apropiado incluyen células bacterianas, tales como *E. coli*, *Streptomyces*, *Salmonella typhimurium* y ciertas especies de *Bacillus*; células fúngicas, tales como especies de *Aspergillus*, por ejemplo *A. niger*, *A. oryzae* y *A. nidulans*, tal como levadura, tal como *Kluyveromyces*, por ejemplo *K. lactis* y/o *Pichia*, por ejemplo *P. pastoris*; células de insecto tales como *Drosophila S2* y *Spodoptera Sf9*; células de animales tales como CHO, COS y melanoma de Bowes; y células vegetales. Los medios de cultivo y condiciones apropiados para las células hospedantes descritas anteriormente son bien conocidos en la técnica.

Los vectores preferidos para uso en bacterias se describen, por ejemplo, en el documento WO-A1-2004/074468, que se incluye aquí como referencia. Otros vectores adecuados serán fácilmente manifiestos para el experto.

Los promotores bacterianos conocidos adecuados para uso en la presente invención incluyen los promotores descritos en el documento WO-A1-2004/074468, que se incluye aquí como referencia.

La transcripción del ADN que codifica una variante de la presente invención mediante eucariotas superiores se puede incrementar insertando una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos de ADN que actúan en cis, usualmente alrededor de 10 a 300 pb, que actúan para incrementar la actividad trascricional de un promotor en un tipo de célula hospedante dado. Los ejemplos de potenciadores incluyen el potenciador de SV40,

que se localiza en el lado tardío del origen de replicación a 100 hasta 270 pb, el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación, y los potenciadores de adenovirus.

5 Para la secreción de la proteína traducida en la luz del retículo endoplásmico, en el espacio periplásmico o en el entorno extracelular, se puede incorporar la señal de secreción apropiada en el polipéptido expresado. Las señales pueden ser endógenas al polipéptido, o pueden ser señales heterólogas.

10 Una variante de la invención se puede expresar en forma tal que puede incluir regiones funcionales heterólogas adicionales, por ejemplo señales de secreción. Una variante de la invención también puede comprender, por ejemplo, una región de aminoácidos esenciales, particularmente aminoácidos cargados, añadidos al término N del polipéptido, por ejemplo para mejorar la estabilidad y persistencia en la célula hospedante, durante la purificación o durante la manipulación y el almacenamiento subsiguientes. También, se pueden añadir restos peptídicos a una variante de la invención, para facilitar la purificación, por ejemplo mediante la adición de restos de histidina o una etiqueta T7.

15 Las variantes de la invención, tales como proteínas de la presente invención o sus equivalentes funcionales, por ejemplo porciones biológicamente activas o sus fragmentos, se pueden enlazar operativamente a un polipéptido no variante (por ejemplo, secuencias de aminoácidos heterólogas) para formar proteínas de fusión. Un "polipéptido no variante", en este contexto, se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a una proteína que no es sustancialmente homóloga a una asparaginasa variante de la invención.

20 Dentro de una proteína de fusión, la variante de la invención puede corresponder a una secuencia de longitud completa o a un fragmento biológicamente activo de un polipéptido de la invención. En una realización preferida, una proteína de fusión de la invención comprende al menos dos porciones biológicamente activas. Dentro de la proteína de fusión, el término "operablemente enlazado" pretende indicar que el polipéptido variante y el polipéptido no variante están fusionados entre sí en el marco. El polipéptido no variante se puede fusionar al término N o al término C del polipéptido variante.

25 Por ejemplo, en una realización, la proteína de fusión es una proteína de fusión en la cual la secuencia o secuencias variantes está/están fusionadas al término C de las secuencias de GST. Tales proteínas de fusión pueden facilitar la purificación de una variante recombinante de acuerdo con la invención. En otra realización, la proteína de fusión es una variante de la invención que contiene una secuencia señal heteróloga en su término N. En ciertas células hospedantes (por ejemplo, células hospedantes de mamífero y de levadura), la expresión y/o la secreción de una variante de la invención se pueden incrementar a través del uso de una secuencia señal heteróloga.

30 En otro ejemplo, la secuencia secretora gp67 de la proteína de cubierta del baculovirus se puede usar como una secuencia señal heteróloga (Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, 1992). Otros ejemplos de secuencias señal heterólogas eucariotas incluyen las secuencias secretoras de melitina y fosfatasa alcalina placentaria humana (Stratagene; La Jolla, California). En aún otro ejemplo, las secuencias señal heterólogas procariontas útiles incluyen la señal secretora phoA (Sambrook et al., más arriba) y la señal secretora de la proteína A (Pharmacia Biotech; Piscataway, Nueva Jersey).

35 Se puede usar una secuencia señal para facilitar la secreción y el aislamiento de una variante de la invención. Las secuencias señal se caracterizan típicamente por un núcleo de aminoácidos hidrófobos, que se escinden generalmente de la proteína madura durante la secreción en uno o más sucesos de escisión. Tales péptidos señal contienen sitios de procesamiento que permiten la escisión de la secuencia señal desde las proteínas maduras a medida que pasan a través de la ruta secretora. La secuencia señal puede dirigir la secreción de la variante, tal como desde un hospedante eucariota en el cual se transforma el vector de expresión, y la secuencia señal se puede escindir posterior o concurrentemente. La variante de la invención se puede purificar fácilmente entonces del medio extracelular mediante métodos conocidos. Alternativamente, la secuencia señal se puede enlazar a la variante de interés usando una secuencia, que facilita la purificación, tal como con un dominio GST. Así, por ejemplo, la secuencia que codifica la variante de la invención se puede fusionar a una secuencia marcadora, tal como una secuencia que codifica un péptido, que facilita la purificación de la variante fusionada de la invención. En ciertas realizaciones preferidas de este aspecto de la invención, la secuencia marcadora es un péptido de hexa-histidina, tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (Qiagen, Inc), entre otros, muchos de los cuales están comercialmente disponibles. Como se describe en Gentz et al, Proc. Nati. Acad. Sci. USA 86:821-824 (1989), por ejemplo, la hexa-histidina proporciona purificación conveniente de la proteína de fusión. La etiqueta HA es otro péptido útil para la purificación que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe, que se ha descrito por Wilson et al., Cell 37:767 (1984), por ejemplo.

50 Una proteína de fusión de la invención se puede producir mediante técnicas estándar de ADN recombinante. Por ejemplo, los fragmentos de ADN que codifican las diferentes secuencias polipeptídicas se ligan juntos en el marco de acuerdo con técnicas convencionales, por ejemplo empleando términos de extremo romo o de extremo escalonado para ligación, digestión mediante enzima de restricción para proporcionar los términos apropiados, llenado de extremos cohesivos según sea adecuado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar la unión indeseable, y ligación enzimática. En otra realización, el gen de fusión se puede sintetizar mediante técnicas

convencionales que incluyen sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, la amplificación mediante PCR de los fragmentos génicos se puede llevar a cabo usando cebadores de anclaje, que dan lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos génicos consecutivos que subsiguientemente se pueden hibridar y reamplificar para generar una secuencia génica quimérica (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel et al. John & Wiley & Sons: 1992). Además, existen comercialmente disponibles muchos vectores de expresión que ya codifican un resto de fusión (por ejemplo, un polipéptido de GST). Un ácido nucleico que codifica una variante se puede clonar en tal vector de expresión de tal manera que el resto de fusión está ligado en el marco a la mencionada variante.

Las expresiones “equivalentes funcionales” y “variantes funcionales” se usan aquí de forma intercambiable. Los equivalentes funcionales según la invención son fragmentos de ADN aislados que codifican un polipéptido que muestra una función particular de una variante como se define aquí. Por lo tanto, los equivalentes funcionales también engloban fragmentos biológicamente activos, y ellos mismos están englobados dentro de la expresión “una variante” de la invención.

Preferiblemente, un equivalente funcional de la invención comprende una o más de las sustituciones descritas aquí. Sin embargo, un equivalente funcional puede comprender una o más modificaciones, además de las sustituciones descritas anteriormente.

Los equivalentes de ácidos nucleicos funcionales pueden contener típicamente mutaciones silenciosas o mutaciones que no alteran la función biológica del polipéptido codificado. En consecuencia, la invención proporciona moléculas de ácidos nucleicos que codifican una proteína de asparaginasa variante que contiene cambios en restos de aminoácidos que no son esenciales para una actividad biológica particular. Tales proteínas variantes difieren en la secuencia de aminoácidos de la secuencia de asparaginasa progenitora de la que derivan, aunque retienen al menos una actividad biológica de la misma, preferiblemente retienen al menos actividad de asparaginasa. En una realización, la molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia nucleotídica que codifica una proteína, en la que la proteína comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga de al menos alrededor de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más homóloga a la secuencia de aminoácidos progenitora (mostrada en SEC ID NO: 3).

Como se define aquí, la expresión “sustancialmente homóloga” se refiere a una primera secuencia de aminoácidos o nucleotídica que contiene un número suficiente o mínimo de aminoácidos o nucleótidos idénticos o equivalentes (por ejemplo, con cadena lateral similar) a una segunda secuencia de ácidos nucleicos o nucleotídica, de forma que las secuencias de aminoácidos o nucleotídicas primera y segunda tienen un dominio común. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos o nucleotídicas que contienen un dominio común que tienen alrededor de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad o más se definen aquí como suficientemente idénticas.

La persona experta reconocerá qué cabmiso se pueden introducir mediante mutación en las secuencias nucleotídicas según la invención, conduciendo de ese modo a cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína resultante sin alterar sustancialmente la función de tal proteína.

En consecuencia, una variante de asparaginasa de la invención es preferiblemente una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos al menos alrededor de 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más homóloga a la secuencia de aminoácidos progenitora mostrada en SEC ID NO:3, y típicamente también retiene al menos una actividad funcional del polipéptido progenitor. Las variantes de la invención, por ejemplo equivalentes funcionales de una proteína según la invención, también se pueden identificar, por ejemplo, seleccionando bibliotecas combinatorias de mutantes, por ejemplo mutantes de truncamiento, de la proteína de la invención para la actividad de asparaginasa. En una realización, se genera una biblioteca variegada de variantes mediante mutagénesis combinatoria al nivel de ácidos nucleicos. Una biblioteca variegada de las variantes se puede producir, por ejemplo, ligando enzimáticamente una mezcla de oligonucleótidos sintéticos en secuencias génicas de tal manera que un conjunto degenerado de secuencias proteicas potenciales es expresable como polipéptidos individuales, o como alternativa, como un conjunto de proteínas de fusión más grandes (por ejemplo, para presentación de fagos). Existe una variedad de métodos que se pueden usar para producir bibliotecas de variantes potenciales de los polipéptidos de la invención a partir de una secuencia oligonucleotídica degenerada. Los métodos para sintetizar los oligonucleótidos degenerados se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Narang (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura et al. (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura et al. (1984) *Science* 198:1056; Ike et al. (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477).

Además, se pueden usar bibliotecas de fragmentos de la secuencia que codifica un polipéptido de la invención para generar una población variegada de polipéptidos para seleccionar una selección subsiguiente de variantes. Por ejemplo, se puede generar una biblioteca de fragmentos de secuencias codificantes tratando un fragmento de PCR bicatenario de la secuencia codificante de interés con una nucleasa en condiciones en las que se produce un corte sólo alrededor de una vez por molécula, desnaturalizando el ADN bicatenario, renaturalizando el ADN para formar un ADN bicatenario que puede incluir pares sentido/antisentido de diferentes productos cortados, eliminando mediante tratamiento con nucleasa S1 las porciones monocatenarias de los dúplex reformados, y ligando en un vector de expresión la biblioteca de fragmentos resultante. Mediante este método, se puede derivar una biblioteca de expresión que codifica fragmentos N-terminales e internos de diversos tamaños de la proteína de interés.

Se conocen varias técnicas en la técnica para seleccionar productos génicos de bibliotecas combinatorias hechas mediante mutaciones de truncamiento puntuales, y para seleccionar bibliotecas de ADNc para productos génicos que tienen una propiedad seleccionada. Las técnicas más ampliamente usadas, que son susceptibles a análisis de alto rendimiento, para seleccionar grandes bibliotecas de genes incluyen típicamente clonar la biblioteca de genes en vectores de expresión replicables, transformar células apropiadas con la biblioteca resultante de vectores, y expresar los genes combinatorios en condiciones en las cuales la detección de una actividad deseada facilita el aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto se detectó. La mutagénesis de ensamblaje recursivo (REM), una técnica que potencia la frecuencia de los mutantes funcionales en las bibliotecas, se puede usar en combinación con los ensayos de selección para identificar variantes de una proteína de la invención (Arkin y Yourvan (1992) Proc. Nati. Acad. Sci. USA 89:7811-7815; Delgrave et al. (1993) Protein Engineering 6(3): 327-331).

Los fragmentos de un polinucleótido según la invención también pueden comprender polinucleótidos que no codifican polipéptidos funcionales. Tales polinucleótidos pueden funcionar como sondas o cebadores para una reacción de PCR.

Se pueden usar ácidos nucleicos según la invención, independientemente de si codifican polipéptidos funcionales o no funcionales, como sondas de hibridación o cebadores de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los usos de las moléculas de ácidos nucleicos de la presente invención que no codifican un polipéptido que tiene actividad de asparaginasa incluyen, entre otros, (1) la hibridación *in situ* (por ejemplo, FISH) a propagaciones cromosómicas de metafase para proporcionar la localización cromosómica precisa de un gen que codifica asparaginasa, como se describe en Verma et al., Human Chromosomes: a Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, Nueva York (1988); (2) el análisis de transferencia Northern para detectar la expresión del ARNm de asparaginasa en tejidos y/o células específicos; y (3) sondas y cebadores que se pueden usar como una herramienta de diagnóstico para analizar la presencia de un ácido nucleico hibridable a tal sonda o cebador en una muestra biológica dada (por ejemplo, tejido).

Las variantes de una enzima asparaginasa progenitora dada se pueden obtener mediante el siguiente procedimiento estándar:

- Mutagénesis (propensa a error, oligonucleótido dopado, oligonucleótido añadido)
- Cribado primario
- Identificación de una variante mejorada (por ejemplo con respecto a la actividad específica)
- Mantenimiento (por ejemplo en cultivo de glicerol, placas de LB-Amp, Mini-Prep)
- Estriado en otro cribado secundario en placa de ensayo
- Secuenciación de ADN
- Transformación en, por ejemplo, *Aspergillus*
- Cultivo, por ejemplo en una escala de 100 ml, purificación, DSC

En otra realización, la invención se refiere a un método para producir una variante de polipéptido de asparaginasa según la invención, método el cual comprende:

- a) seleccionar un polipéptido de asparaginasa progenitor que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID NO: 3;
- b) sustituir al menos un resto de aminoácido que corresponde a cualquiera de 53, 63, 66, u 88, definiéndose dichas posiciones con referencia a SEC ID NO: 3;
- c) sustituir opcionalmente uno o más aminoácidos adicionales como se definen en b);
- d) preparar la variante que resulta de las etapas a)-c), en el que la variante tiene al menos 80% de identidad con SEC ID NO: 3;
- e) determinar la actividad específica a al menos un pH y/o el óptimo de pH de la variante; y
- f) seleccionar una variante que tiene una mayor actividad específica a al menos un pH en comparación con el polipéptido de asparaginasa progenitor, y/o un mayor óptimo de pH en comparación con el polipéptido de asparaginasa progenitor, para producir de ese modo una variante de polipéptido de asparaginasa.

El polipéptido de asparaginasa progenitor tiene la secuencia expuesta en SEC ID NO: 3.

Más preferiblemente, en la etapa b) del método según la invención, se sustituye al menos un resto de aminoácido que corresponde a cualquiera de 63 u 88, definiéndose dichas posiciones con referencia a SEC ID NO: 3, y en el que la variante tiene al menos 80% de homología con SEC ID NO: 3.

Incluso más preferiblemente en la etapa b) del método según la invención, el resto de aminoácido sustituido corresponde a uno o más de Tyr en la posición 53, Gly o Val o Ser en la posición 63, Pro en la posición 66, Tyr o Pro en la posición 88, definiéndose dichas posiciones con referencia a SEC ID NO: 3.

5 En una realización del procedimiento de la invención, en la etapa e), la actividad específica se determina a un pH entre 4 y 8. En un aspecto de la etapa e), antes de determinar la actividad específica a al menos un pH y/o el óptimo de pH de la variante, se puede medir la relación, a una temperatura específica, entre la actividad de asparaginasa a pH 7 y la actividad de asparaginasa a pH 5 de la variante, y se puede seleccionar una variante, en el que dicha relación es mayor que la del polipéptido de asparaginasa progenitor.

10 En otra realización del procedimiento de la invención, en la etapa f), se selecciona una variante que tiene una mayor actividad específica a al menos un pH, preferiblemente a un pH entre 4 y 8, en comparación con el polipéptido progenitor, y/o que tiene un mayor óptimo de pH en comparación con el polipéptido progenitor. Preferiblemente, la variante tiene una mayor actividad específica a al menos un pH, preferiblemente un pH entre 4 y 8, en comparación con el polipéptido progenitor, y un mayor óptimo de pH en comparación con el polipéptido progenitor. En otra
15 realización del procedimiento de la invención, en la etapa f), se selecciona una variante que tiene una mayor actividad específica a al menos un pH, preferiblemente un pH entre 4 y 8, en comparación con el polipéptido progenitor.

En otra realización, la invención se refiere a células, por ejemplo células hospedantes transformadas o células hospedantes recombinantes, que contienen un ácido nucleico englobado por la invención. Una "célula transformada" o "célula recombinante" es una célula en la que (o en un ancestro en el que) se ha introducido, por medio de
20 técnicas de ADN recombinante, un ácido nucleico según la invención. Se incluyen células tanto procariontas como eucariotas, por ejemplo bacterias, hongos, levaduras, y similares; se prefieren especialmente células de hongos filamentosos, en particular *Aspergillus niger*.

Se puede escoger una célula hospedante que modula la expresión de las secuencias insertadas, o modifica y procesa de una manera específica y deseada el producto codificado por la secuencia de ácido nucleico incorporada. Tales modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de productos proteicos
25 pueden facilitar el funcionamiento óptimo de la proteína codificada.

Diversas células hospedantes tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento post-traducciona l y la modificación de proteínas y productos génicos. Se pueden escoger estirpes celulares o sistemas de hospedantes apropiados, familiares para los expertos en la técnica de biología molecular y/o microbiología, para asegurar la modificación y procesamiento deseados y correctos de la proteína extraña expresada. Para este fin, se pueden usar células hospedantes eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento apropiado del transcrito primario, glicosilación, y fosforilación del producto génico. Tales células hospedantes son bien conocidas en la técnica.
30

Las células hospedantes también incluyen, pero no se limitan a, estirpes celulares de mamíferos, tales como CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, WI38, y estirpes celulares del plexo coroideo.
35

Si se desea, una estirpe celular transfectada de forma estable puede producir una variante según la invención. Hay disponibles al público un número de vectores adecuados para la transfección estable de células de mamíferos; también se conocen públicamente métodos para construir tales estirpes celulares, por ejemplo en Ausubel et al. (más arriba).

40 La presente invención describe además una composición que comprende las variantes de asparaginasa según la invención. La composición puede comprender opcionalmente otros ingredientes, tales como, por ejemplo, otras enzimas. Las variantes de asparaginasa según la invención, o las composiciones que comprenden dichas asparaginasas, se pueden usar en la producción de un producto alimentario. En una realización de la invención, las variantes o composiciones de asparaginasa según la invención se pueden usar para reducir la cantidad de acrilamida formada en el producto alimentario térmicamente procesado, basado en la materia prima que contiene asparagina. Por ejemplo, se pueden usar en un procedimiento para la producción de un producto alimentario que implica al menos una etapa de calentamiento, que comprende añadir una o más enzimas asparaginasa a una forma intermedia de dicho producto alimentario en dicho procedimiento de producción, con lo que la enzima se añade antes de dicha etapa de calentamiento en una cantidad que es eficaz para reducir el nivel de asparagina que está presente en dicha forma intermedia de dicho producto alimentario. Tal procedimiento se describe en el documento WO 04/030468, cuyo procedimiento y todas sus preferencias se incorporan aquí como referencia. También en el documento WO 04/026043, se describen procedimientos adecuados en los que se podría usar la asparaginasa según la invención. Los procedimientos descritos en el documento WO 04/026043 y todas las preferencias descritas se incorporan aquí como referencia.
50

Una forma intermedia del producto alimentario se define aquí como cualquier forma que aparece durante el procedimiento de producción antes de obtener la forma final del producto alimentario. La forma intermedia puede comprender las materias primas individuales usadas, y/o su mezcla, y/o mezclas con aditivos, y/o auxiliares del procesamiento, o la forma subsiguientemente procesada de las mismas. Por ejemplo, para el producto alimentario
55

de pan, las formas intermedias comprenden por ejemplo trigo, harina de trigo, su mezcla inicial con otros ingredientes del pan tales como por ejemplo agua, sal, levadura y composiciones que mejoran el pan, la masa mezclada, la masa amasada, la masa fermentada, y la masa parcialmente cocida. Por ejemplo, para varios productos a base de patata, los copos o gránulos de patata deshidratados son productos intermedios, y la masa de maíz es un producto intermedio para los chips de tortilla.

El producto alimentario se puede obtener a partir de al menos una materia prima que es de origen vegetal, por ejemplo patata, tabaco, café, cacao, arroz, cereal, por ejemplo trigo, centeno, maíz, cebada, avena a medio moler, trigo sarraceno y avena. Trigo, aquí y en lo sucesivo, pretende englobar todas las especies conocidas del género *Triticum*, por ejemplo *aestivum*, *durum* y/o *spelta*. También se incluyen en el alcance de esta invención productos alimentarios obtenidos a partir de más de una materia prima o intermedio, por ejemplo productos alimentarios que comprenden tanto trigo (harina y/o almidón) como patata. Los ejemplos de productos alimentarios en los que el procedimiento según la invención puede ser adecuado son cualesquiera productos a base de harinas - por ejemplo pan, hojaldre, tarta, pretzels, bagels, tarta de miel holandesa, galletas, pan de jengibre, torta de jengibre y galleta de biscote - y cualesquiera productos a base de patatas - por ejemplo patatas fritas, patatas fritas francesas, patatas fritas inglesas, croquetas.

Se sabe que las materias primas como se citan aquí contienen cantidades sustanciales de asparagina, que está implicada en la formación de acrilamida durante la etapa de calentamiento del procedimiento de producción. Como alternativa, la asparagina se puede originar a partir de otras fuentes distintas de las materias primas, por ejemplo a partir de hidrolizados proteicos, tales como extractos de levadura, hidrolizado de soja, hidrolizado de caseína, y similares, que se usan como un aditivo en el procedimiento de producción de alimentos. Un procedimiento de producción preferido es la cocción del pan y otros productos cocidos a partir de harina de trigo y/o harinas de otro origen de cereal. Otro procedimiento de producción preferido es la fritura por inmersión de patatas fritas inglesas a partir de rodajas de patata.

Las etapas de calentamiento preferidas son aquellas en las que al menos una parte del producto alimentario intermedio, por ejemplo la superficie del producto intermedio, se expone a temperaturas a las que se promueve la formación de acrilamida, por ejemplo 110°C o mayor, 120°C o mayores temperaturas. La etapa de calentamiento en el procedimiento según la invención se puede llevar a cabo 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, tal como la fritura de patatas fritas inglesas, por ejemplo a 160-190°C.

Los productos alimentarios son obtenibles mediante el procedimiento de la invención como se describe aquí anteriormente, o mediante el uso de la nueva asparaginasa como se describe aquí anteriormente para producir productos alimentarios. Estos productos alimentarios se caracterizan por niveles significativamente reducidos de acrilamida en comparación con los productos alimentarios obtenibles mediante procedimientos de producción que no comprenden añadir una o más enzimas en una cantidad que es eficaz reduciendo el nivel de aminoácidos que están implicados en la formación de acrilamida durante dicha etapa de calentamiento. El procedimiento según la invención se puede usar para obtener una disminución del contenido de acrilamida del producto alimentario producido, preferiblemente más de 50%, más preferiblemente más de 20%, incluso más preferiblemente 10%, y lo más preferible más de 5%, en comparación con un producto alimentario obtenido con el procedimiento convencional.

Una aplicación adicional para las variantes de asparaginasa según la invención es el empleo en la terapia de tumores. El metabolismo de células tumorales requiere L-asparagina, que se puede degradar rápidamente por asparaginasa. La asparaginasa según la invención también se puede usar como un auxiliar en el tratamiento de cierta leucemia humana. La administración de asparaginasa en animales experimentales y en seres humanos conduce a la regresión de ciertos linfomas y leucemias. Por lo tanto, en una realización, la invención se refiere a asparaginasa o una composición según la invención para uso como medicamento, por ejemplo en el tratamiento de tumores, por ejemplo en el tratamiento de linfomas o leucemias en animales o seres humanos.

Las variantes de asparaginasa según la invención se pueden producir convenientemente en microorganismos. En los procedimientos anteriores, es ventajoso usar asparaginasa que se obtienen mediante técnicas de ADN recombinante. Tales enzimas recombinantes tienen un número de ventajas, tal como la producción a un precio de coste menor, rendimiento elevado, libre de agentes contaminantes tales como bacterias o virus, pero también libre de toxinas bacterianas o que contaminan otras actividades enzimáticas.

La invención se ilustra aquí en lo sucesivo mediante los siguientes Ejemplos no limitantes.

EJEMPLOS

Materiales y métodos

Ensayo de asparaginasa a fin de medir la dependencia del pH en el intervalo pH = 4 a pH = 9

La actividad de asparaginasa se midió usando como sustrato L-asparagina. La cantidad de amoníaco que se liberó por la acción de la enzima se midió según la reacción de Berthelot. Los reactivos listos para el uso, fenol-nitroprusiato e hipoclorito alcalino, se obtuvieron de Sigma. Se mezclaron 100 µl de muestra de enzima con 2000 µl

de L-asparagina 100 mM en una mezcla de tampón de ácido cítrico 50 mM y pirofosfato de sodio 50 mM del pH deseado. Tras la incubación a 37°C durante 30 minutos, la reacción se detuvo añadiendo 400 µl de ácido tricloroacético al 25%, con lo que después se añadieron 2500 µl de agua. Durante la incubación, la temperatura se fijó a 37°C, excepto que se indique de otro modo.

- 5 Se debería entender por la persona experta en la técnica que la dosificación de la enzima se escogió de tal manera que, después de la incubación en las condiciones anteriores, se obtuvo una señal significativamente por encima del fondo, pero todavía dentro de un intervalo en el que las señales obtenidas son proporcionales a la cantidad de enzima añadida. Preferiblemente, la reacción fue de orden cero.

10 Después de detener la reacción, se añadieron 4 µl de la mezcla de incubación a 156 µl de agua. Subsiguientemente se añadieron 34 µl de disolución de fenol/nitroprusiato (Sigma P6994) y 34 µl de disolución de hipoclorito alcalino (Sigma A1727). Después de 676 segundos de incubación a 37°C, la extinción se midió a 600 nm. Las lecturas se corrigieron para la señal de fondo al incluir los blancos apropiados. Como blanco, se usó una muestra con enzimas inactivadas (TCA). Los ensayos se realizaron en un autoanalizador, por ejemplo un Konelab Arena 30 (Thermo Scientific). La actividad se determinó usando una recta de calibración obtenida representando gráficamente la absorbancia medida a 600 nm frente a las concentraciones de sulfato de amonio conocidas de una serie patrón. La actividad se expresó en unidades, en el que una unidad se define como la cantidad de enzima requerida para liberar un micromol de amoníaco a partir de L-asparagina por minuto en las condiciones de ensayo definidas.

Ensayo de asparaginasa a fin de medir la dependencia del pH en el intervalo pH = 4 a pH = 8

20 El método se ejecutó de la misma manera que el método descrito anteriormente para medir la dependencia de la actividad con respecto al pH para intervalo pH = 4 a pH = 9, con la diferencia de que se mezclaron 100 µl de muestra de enzima con 2000 µl de L-asparagina 100 mM en un tampón de fosfato/ácido cítrico 50 mM del pH deseado.

Ensayo manual de asparaginasa a fin de medir la actividad a pH = 5 y pH = 7

25 El ensayo se llevó a cabo por ejemplo en placas de microtitulación (MTP's) o tubos. Para identificar asparaginasas con un perfil de actividad a pH desplazado, se midió la actividad a pH = 5 y pH = 7. Se mezclaron 10 µl de muestra de enzima con 190 µl de L-asparagina 100 mM en tampón de ácido cítrico 100 mM pH 5,0 o tampón de fosfato 100 mM pH 7,0. Después de la incubación a temperatura ambiente y durante 1 h, la reacción se detuvo añadiendo 100 µl de ácido tricloroacético al 12,5%. La dosificación de la enzima se escogió de tal manera que después de una incubación durante 1 hora a temperatura ambiente se obtuvo una señal significativamente por encima del fondo. Después de detener la reacción, se añadieron 95 µl de agua a 8 µl de la mezcla de incubación. Subsiguientemente, se añadieron 70 µl de disolución de fenol/nitroprusiato (Sigma P6994) y 70 µl de disolución de hipoclorito alcalino (Sigma A1727). Después de 60 minutos de incubación a temperatura ambiente, se midió la extinción a 620 nm. Las lecturas se corrigieron para la señal del fondo al incluir los blancos apropiados, por ejemplo muestra inactivada y/o sobrenadante procedente de muestras de fermentación de cepas hospedantes vacías. La cepa vacía indica una cepa hospedante que no se ha transformado para contener el gen de asparaginasa. La actividad se determinó usando una recta de calibración formada representando la absorbancia medida a 620 nm frente a las concentraciones de sulfato de amonio conocidas de una serie patrón. La actividad se expresa en unidades, en la que una unidad se define como la cantidad de enzima requerida para liberar un micromol de amoníaco a partir de L-asparagina por minuto en condiciones de ensayo definidas.

En todos los ensayos, la actividad de las muestras de asparaginasa se expresaron en unidad/ml.

40 **Ejemplo 1**

Fermentación, aislamiento y purificación de asparaginasas según la invención

45 Las asparaginasas de la invención se obtuvieron mediante la construcción de plásmidos de expresión que contienen una secuencia de ADN que codifica la asparaginasa de la invención, transformando una cepa de *Aspergillus niger* con el plásmido, y haciendo crecer las cepas de *Aspergillus niger* como se describe en el documento WO 2004/030468.

50 Después de hacer crecer *Aspergillus niger* que contiene los plásmidos de expresión apropiados, se prepararon sobrenadantes libres de células mediante centrifugación del caldo de fermentación a 5000 x g durante 30 minutos a 4°C. Si es necesario, los sobrenadantes se filtraron adicionalmente sobre un filtro Miracloth (número de catálogo de Calbiochem 475855) y un filtro de microfibras de vidrio Whatmann GF/A (150 mm Ø), respectivamente, para eliminar cualquier sólido. Para eliminar cualquier material fúngico, los sobrenadantes se pudieron ajustar a pH = 5 con KOH 4N y se filtraron de forma estéril sobre un filtro de 2 µm (parte superior de la botella) con succión. Los sobrenadantes se almacenaron hasta el uso a 4°C, o se congelaron a -20°C si es necesario.

55 En el caso de que las impurezas fuesen más de 60% p/p, la asparaginasa se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico aniónico, partiendo de sobrenadantes libres de células o ccUF desalado vía una columna PD-10 (Amersham Biosciences). El material desalado se aplicó a una columna Mono-Q o Q-sefarosa equilibrada en tampón

de histidina 20 mM pH 5,96. Después de un lavado exhaustivo, las asparaginasa se eluyeron de la columna usando un gradiente de 0 a 1M de NaCl.

La pureza de las fracciones de sobrenadantes que contienen la actividad de asparaginasa, o de las fracciones de asparaginasa purificadas (determinado en mg de proteína/ml), se comprobó mediante cromatografía de exclusión de tamaños analítica (HP-SEC: cromatografía de exclusión de tamaños de altas prestaciones, TSKgel 3000SW-XL, columna 300*7,8 mm; intervalo MW 10-300 kDa, tampón de fosfato 100 mM pH 7 y pH 5,96). Todos los caudales fueron 1 ml/min. (excepto para la inyección de la muestra en la columna de Q-sefarosa, que fue 5 ml/min.). La detección de las proteínas eluidas se realizó a 280 nm. La concentración de la asparaginasa de tipo salvaje de *Aspergillus niger* eluida se calculó a partir de la extinción a 280 nm (A280) usando un coeficiente de extinción molar de $10240 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ($A_{280}^{1\text{cm}, 1\text{mg/ml}} = 0,28$, en el que $A_{280}^{1\text{cm}, 1\text{mg/ml}}$ es la extinción a 280 nm medida con una longitud de recorrido de 1 cm y a una concentración de proteína pura de 1 mg/ml). La medida de la A280 se llevó a cabo en un espectrofotómetro Uvikon XL Secomam (Beun de Ronde, Abcoude, Países Bajos). Para las asparaginasa que corresponden a ASN15 y ASN 16, se usó el mismo coeficiente de extinción que el de la asparaginasa de tipo salvaje de *Aspergillus niger*. En caso de impurezas que absorben a 280 nm, la concentración de asparaginasa se corrigió basándose en el cromatograma de HP-SEC multiplicando la A280 medida de la muestra de asparaginasa por la relación del área bajo el pico de asparaginasa y el área total de los picos que absorben a 280 nm. Cuando los picos de asparaginasa no estuvieron claramente separados de otros picos, se tomaron las alturas de los picos en lugar de las áreas de los picos.

Para asparaginasa que corresponden a ASN 01 a ASN14, el contenido de asparaginasa (determinado en mg de proteína/ml) se puede determinar mediante electroforesis en gel PAA-SDS usando geles de 12 pocillos con Bis-Tris al 4-12% NuPAGE® Novex (Invitrogen, NP0322BOX). Se incubó 1 µl de sobrenadante de cultivo con 1 µl de 10 x NuPAGE® Sample Reducing Agent (Invitrogen, NP0004), 2,5 µl de 4 x NuPAGE LDS Sample Buffer (Invitrogen, NP0007) y 5,5 µl de agua milliQ durante 10 minutos a 70°C. La muestra reducida resultante se cargó en el gel. Como marcador de tamaño se usó el patrón previamente teñido SeeBlue® Plus2 (Invitrogen, LC5925). Además, se cargaron 0,5 µg de BSA (Sigma A9418) como calibrador para la cantidad de proteína. Los geles se hicieron pasar en tampón de NuPAGE® MES SDS (Invitrogen, NP0002), que contiene NuPAGE® Antioxidant (Invitrogen, NP0005) durante 35 minutos a 200 V. Tras la electroforesis, los geles se fijaron durante 2 x 30 minutos en disolución Fix (7% de HAc (v/v) y 10% de etanol (v/v)), se tiñeron toda la noche con tinción de gel de proteína SYPRO Ruby (Invitrogen S12000) y se destiñeron en disolución Fix durante 2 x 30 minutos. Subsiguientemente, los geles se lavaron con agua desmineralizada y se barriaron con el escáner Typhoon 9200 (GE Healthcare). El volumen de los picos se calculó usando software Image Quant TLv2003.02, y las concentraciones de proteína se calcularon basándose en la banda de proteína de BSA.

Ejemplo 2

Comportamiento de las asparaginasa variantes según la invención

Se identificó una librería al azar de mutantes de asparaginasa de *A. niger* (en las que el polipéptido progenitor fue aquel según SEC ID NO: 3) en busca de mutantes con un perfil de actividad con el pH cambiado. A fin de encontrar mutantes con actividad mejorada a pH más alcalino, se determinó la actividad de la asparaginasa a pH = 5 y pH = 7. Subsiguientemente, se determinó la relación entre la actividad a pH = 7 y la actividad a pH = 5. Esta relación se muestra en la tabla 1. Una mayor relación indica un desplazamiento del perfil de actividad con el pH hacia pH = 7.

Variante	Sustitución de aminoácidos si se compara con SEC ID NO: 3	Relación entre la actividad a pH=7 y la actividad a pH=5	pH alcalino al que todavía se observa actividad del 50%	Secuencia de aminoácidos
	WT	0,42	6,7	SEC ID NO: 3
ASN01	D63G+G132S	1,21	8,0	SEC ID NO: 4
ASN02	D63G+D111G+ R122H	1,25	8,1	SEC ID NO: 5
ASN03	D63V+T300I	0,60	7,3	SEC ID NO: 6
ASN04	S64P+I310V	0,57	7,2	SEC ID NO: 7
ASN05	T41I+S66P+V371M	0,90	7,8	SEC ID NO: 8
ASN06	A76T+A101V	0,88	7,6	SEC ID NO: 9
ASN07	V77I+V123A+E314D	0,54	7,1	SEC ID NO: 10

Variante	Sustitución de aminoácidos si se compara con SEC ID NO: 3	Relación entre la actividad a pH=7 y la actividad a pH=5	pH alcalino al que todavía se observa actividad del 50%	Secuencia de aminoácidos
ASN08	S88Y	0,63	7,4	SEC ID NO: 11
ASN09	S88P+I161L+R262C	0,73	7,6	SEC ID NO: 12
ASN10	D140N	0,73	7,4	SEC ID NO: 13
ASN11	D91E+A170T+ R262H	0,83	7,5	SEC ID NO: 14
ASN12	L90V+K119N+ Y228H+R262C	0,62	7,3	SEC ID NO: 15
ASN13	F53Y+K119N	0,48	6,9	SEC ID NO: 16
ASN14	G195D+A293V	0,75	7,4	SEC ID NO: 17

Tabla 1: Tercera columna: Relación entre la actividad a pH = 7 y la actividad a pH = 5 para mutantes seleccionados. El tipo salvaje (WT) es asparaginasa de *A. niger* (documento WO 2004/030468). Cuarta columna: El desplazamiento del pH del extremo alcalino del perfil de actividad con el pH representado por el pH en el que el mutante todavía muestra 50% de su actividad catalítica máxima. Los perfiles de actividad con el pH se determinaron a 37°C usando sobrenadantes libres de células. La actividad se midió en el intervalo pH = 4 a pH = 8, usando un sistema de tampón de fosfato/ácido cítrico.

Los mutantes con una relación mayor que la asparaginasa de *A. niger* de tipo salvaje se ensayaron adicionalmente para establecer en qué grado el perfil de actividad con el pH se desplazó hacia el pH alcalino. Para estos mutantes, se midió un perfil de actividad con el pH completo, y se mostró que en particular el extremo alcalino del perfil de actividad con el pH se había desplazado hacia mayor pH. El pH al que el extremo alcalino del perfil de actividad con el pH muestra 50% de la actividad máxima de un mutante en su óptimo de pH se toma como un indicador para un desplazamiento del extremo alcalino del perfil de actividad con el pH en comparación con el tipo salvaje (tabla 1). Un desplazamiento hacia un pH mayor indica una mayor actividad en condiciones más alcalinas. Tales mutantes son en particular beneficiosos en aplicaciones que requieren más condición alcalina.

Cuando se seleccionan mutantes con una menor relación entre la actividad a pH = 7 y la actividad a pH = 5, se observa que el extremo alcalino del perfil de actividad con el pH se desplaza hacia un pH más bajo (tabla 2).

Variante	Sustitución de aminoácidos si se compara con SEC ID NO: 3	Relación entre la actividad a pH=7 y la actividad a pH=5	pH alcalino al que todavía se observa actividad del 50%	Secuencia de aminoácidos
	WT	0,42	6,7	SEC ID NO: 3
ASN15	T73K+S74A+ A293S	0,37	6,5	SEC ID NO: 18
ASN16	T73K+S74A+ E106P+A293S +G297S+T299S+Q319A +M321T+ V324G	0,08	5,9	SEC ID NO: 19

Tabla 2: Relación entre la actividad a pH = 7 y actividad a pH = 5 para mutantes seleccionados. El tipo salvaje (WT) es asparaginasa de *A. niger* (documento WO 2004/030468). Los perfiles de actividad con el pH se determinaron a 37°C usando sobrenadantes libres de células. La actividad se midió en el intervalo pH = 4 a pH = 8, usando un sistema de tampón de fosfato/ácido cítrico.

La dependencia de la actividad del pH y el óptimo del pH

La dependencia del pH de la actividad de asparaginasa para los mutantes se determinó en tampón de fosfato/citrato 50 mM para el intervalo de pH pH = 4 a pH = 8 usando sobrenadantes libres de células. El pH al que la actividad más elevada se observó para un mutante se denomina el óptimo de pH para el mencionado mutante. En las tablas 3 y 4, la actividad máxima observada para un mutante se ajusta a 100%, y se muestran las actividades de dicho mutante a otros valores de pH como porcentaje de la actividad máxima observada para dicho mutante. En la tabla 3, el perfil de actividad con el pH se determinó para el intervalo de pH pH = 4 a pH = 8 usando el sistema de tampón de fosfato/ácido cítrico. En la tabla 4, el perfil de actividad con el pH se determinó para el intervalo de pH pH = 4 a pH = 9 usando el sistema de tampón de pirofosfato/ácido cítrico.

Variante	Sustitución de aminoácidos si se compara con SEC ID NO: 3	pH=4	pH=5	pH=6	pH=7	pH=8
ASN03	D63V+T300I	79%	100%	91%	60%	16%
ASN04	S64P+I310V	99%	100%	84%	57%	16%
ASN05	T41I+S66P+ V371M	88%	99%	100%	89%	40%
ASN07	V77I+V123A+ E314D	100%	100%	81%	54%	15%
ASN09	S88P+I161L+ R262C	89%	100%	93%	73%	33%
ASN10	D140N	77%	95%	100%	69%	11%
ASN12	L90V+K119N+ Y228H+R262C	91%	100%	87%	62%	19%
ASN13	F53Y+K119N	98%	100%	76%	48%	18%
WT	WT	100%	99%	72%	43%	14%

Tabla 3: La dependencia del pH de la actividad de asparaginasa para los mutantes en comparación con asparaginasa de *A. niger* de tipo salvaje (wt) (documento WO 2004/030468). La actividad más elevada que se observó para cada asparaginasa se ajustó a 100%. La actividad se determinó usando sobrenadante libre de células a 37°C en el sistema de tampón de fosfato/ácido cítrico.

5

Variante	Sustitución de aminoácidos si se compara con SEC ID NO: 3	pH=4	pH=5	pH=6	pH=7	pH=8	pH=9
ASN01	D63G+G 132S	72%	83%	97%	100%	50%	0%
ASN02	D63G+ D111G+R122H	71%	80%	93%	100%	56%	1%
ASN06	A76T+A101V	91%	100%	98%	88%	22%	1%
ASN08	S88Y	96%	100%	86%	66%	23%	1%
ASN11	D91E+A170T+ R262H	74%	83%	100%	94%	11%	0%
ASN14	G195D+A293V	77%	100%	86%	75%	7%	0%
WT	WT	100%	100%	72%	43%	9%	0%

Tabla 4: La dependencia del pH de la actividad de asparaginasa para los mutantes en comparación con asparaginasa de *A. niger* de tipo salvaje (wt) (documento WO 2004/030468). La actividad más elevada que se observó para cada asparaginasa se ajustó a 100%. La actividad se determinó usando sobrenadante libre de células a 37°C en el sistema de tampón de pirofosfato/ácido cítrico.

10

Aparte de un desplazamiento del extremo alcalino del perfil de actividad con el pH, también hay un desplazamiento del óptimo de pH hacia un mayor pH. Ambos mutantes que contienen la mutación D63G muestran un desplazamiento del óptimo de pH a pH = 7. Los mutantes D63G contienen mutaciones adicionales. Sin embargo, estas mutaciones adicionales son diferentes en cada mutante D63G, mientras que los perfiles de actividad con el pH son casi idénticos. Por lo tanto, D63G parece provocar el desplazamiento observado del perfil de actividad con el pH. El óptimo de pH del mutante D140N, el mutante que contiene A170T, y el mutante que contiene la mutación S66P, se desplazan hacia pH = 6.

15

Los mutantes que quedan muestran un óptimo de pH más explícito a pH = 5 en comparación con el tipo salvaje. Las tablas 3 y 4 muestran claramente el desplazamiento del extremo alcalino del perfil de actividad con el pH hacia un pH mayor, dando como resultado un perfil más amplio de actividad con el pH con una actividad relativa en particular incrementada para el intervalo pH = 6 a pH = 8, mientras que al mismo tiempo también se mantiene una actividad sustancial en la región ácida pH = 4 a pH = 6.

20

Actividad específica como función del pH

La actividad específica de las variantes de asparaginasa se determinó a pH = 4, pH = 5, pH = 6, pH = 7, pH = 8 a 37°C en tampón de fosfato/citrato 50 mM usando sobrenadantes libres de células.

25

Variante	Sustitución de aminoácidos si se compara con SEC ID NO: 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
WT	WT	100%	100%	100%	100%	100%
ASN01	D63G+G132S	86%	96%	156%	254%	408%
ASN02	D63G+D111G+ R122H	87%	101%	156%	282%	543%
ASN04	S64P+I310V	89%	91%	106%	120%	105%
ASN05	T41I+S66P+V371M	164%	187%	260%	392%	527%
ASN06	A76T+A101V	64%	71%	97%	148%	227%
ASN08	S88Y	83%	87%	107%	129%	159%
ASN09	S88P+I161L+R262C	135%	152%	195%	257%	350%
ASN11	D91E+A170T+ R262H	46%	51%	66%	91%	133%
ASN12	L90V+K119N+ Y228H+R262C	82%	92%	111%	132%	120%
ASN13	F53Y+K119N	185%	189%	199%	214%	235%
ASN14	G195D+A293V	79%	93%	110%	159%	158%
ASN15	T73K+S74A+A293S G297S+T299S+Q319A+M321T+ V324G	166%	173%	154%	151%	142%

Tabla 5: La actividad específica (medida dividiendo la actividad de una muestra (en unidades/ml) entre mg/ml de asparaginasa presente en la muestra) de las variantes con respecto a asparaginasa de *A. niger* de tipo salvaje (documento WO 2004/030468) a los valores de pH indicados usando asparagina como sustrato. Para cada pH, la actividad específica de tipo salvaje se ajustó a 100%, y la actividad de los mutantes se calculó con respecto a la asparaginasa de tipo salvaje. Cuando la actividad de los mutantes estuvo por debajo de 100%, la actividad se omitió de la tabla. La actividad se determinó a 37°C. La cantidad de proteína asparaginasa en los sobrenadantes libres de células se determinó llevando a cabo experimentos de electroforesis en gel PAA-SDS y barriendo los geles como se describe en material y métodos. Para T73K+S74A+A293S y T73K+S74A+A293S+E106P+G297S+T299S+Q319A+M321T+V324G, la concentración de proteína asparaginasa derivó de una medida de A280 aplicando una corrección para cualesquiera impurezas en base a la cromatografía de HP-SEC.

La tabla 5 muestra que la actividad específica de los mutantes a pH = 6, pH = 7 y pH = 8 se ha mejorado sustancialmente en comparación con asparaginasa de tipo salvaje. En particular, los mutantes T73K+S74A+A293S, T41I+S66P+V371M, S88P+I161L+R262C y F53Y+K119N son muy útiles debido a que muestran una mayor actividad a lo largo de todo el intervalo de pHs pH = 4 a pH = 8. El mutante T73K+S74A+A293S+E106P+G297S+T299S+Q319A+M321T+V324G es más activo en la región de pH ácido, pH = 4 a pH = 6.

Óptimo de temperatura

A fin de verificar la dependencia de la actividad con la temperatura, se midió la actividad a diferentes temperaturas. En un ensayo, la reacción enzimática se detuvo después de 10 minutos; en un segundo ensayo, la reacción se detuvo después de 30 minutos. La dosificación de la enzima en el ensayo de 30 minutos fue un tercio de la dosificación en el ensayo de 10 minutos. Si las enzimas son estables en las condiciones aplicadas, la actividad observada debería ser similar. En el caso de que se produzca inactivación, se espera que la actividad disminuya después de un tiempo de ensayo más prolongado. Los resultados se muestran en la tabla 6.

Variante	Sustitución de aminoácidos si se compara con SEC ID NO: 3	50°C		60°C		70°C	
		10 min	30 min	10 min	30 min	10 min	30 min
WT	WT	100%	98%	98%	97%	62%	58%
ASN01	D63G+G132S	67%	70%	89%	95%	100%	107%

Variante	Sustitución de aminoácidos si se compara con SEC ID NO: 3	50°C		60°C		70°C	
		10 min	30 min	10 min	30 min	10 min	30 min
ASN02	D63G+D111G +R122H	70%	72%	87%	91%	99%	106%
ASN05	T41I+S66P+V 371 M	77%	79%	93%	98%	100%	102%
ASN09	S88P+I161L+ R262C	84%	87%	100%	100%	95%	95%
ASN08	S88Y	85%	93%	100%	104%	85%	88%

Tabla 6: Dependencia de la actividad con la temperatura. El ensayo se llevó a cabo a pH = 5 en tampón de fosfato/ácido cítrico 50 mM. La dosificación de enzima en el ensayo de 30 minutos fue un tercio de la dosificación en el ensayo de 10 minutos. La actividad más elevada a un tiempo de incubación de 10 minutos se ajustó a 100%.

5 La tabla 6 indica que la estabilidad de las variantes es muy similar a asparaginasa de *Aspergillus niger* de tipo salvaje. Los mutantes no muestran reducción en la actividad después de la incubación durante 30 minutos en comparación con 10 minutos, incluso a 70°C, lo que indica que los mutantes son estables al menos durante 30 minutos a 70°C. Sorprendentemente, se observa que el óptimo de temperatura de los mutantes se desplaza hacia una mayor temperatura. Para tipo salvaje, el óptimo de temperatura está en 50°C, considerando las temperaturas que se ensayan. Para los mutantes S16A+D63G+G132S, D63G+D111G+R122H y T41I+S66P+V371M, se ha desplazado hasta 70°C. Tales propiedades son en particular útiles en aplicaciones que requieren asparaginasas que trabajan a temperaturas elevadas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> DSM IP Assets B.V.

<120> VARIANTES DE LA ENZIMA ASPARAGINASA Y SUS USOS

15 <130> 25906WO

<160> 19

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 3223

20 <212> ADN

<213> *Aspergillus niger*

<400> 1

ES 2 524 343 T3

tggggggaac	ttgcatctga	gagcatcata	ctagttacta	ctactactac	tacttgccga	60
tgaataaaca	tctgtctgt	actacgcac	gccgtcttg	tgacatggag	atataatgtg	120
ggctccgaga	gttttgatag	cagtagccaa	ttaactagta	gatgctagta	ctactctagt	180
aatttggggg	cgaatgttga	atccagctca	tgccaattga	catctggaga	tctccacgag	240
acaacgagat	aagatgaaat	attgctgtca	tgggtgataa	ctagatgott	cgagaaggat	300
tcttgaggat	tgctcatcg	catgggataa	tatcacccctc	gggtggacct	tcccggctgt	360
tggggccttat	cgtggaagag	tcacccccga	tatcgggtggg	ccaagccctt	tatcaatcat	420
catcctatca	gtttccacc	acaagatagc	ctatggacc	tgattccctt	ctagccacag	480
agactagtac	tagtctatca	tgtcgactcc	atgtggagaa	accctgataa	gacctatgtg	540
aggaggagat	agcaagcctc	cacagaaaca	atatcatctc	caoctgcaat	cacggttgga	600
ttccgaatac	accgcgcgc	tggcaagcac	atggggataa	aaatgctgaa	accaggcaag	660
atgaattgga	agagaagcca	gcagagacca	tcgcatccgt	cttcatcatg	cctctcaagc	720
cgatttctct	gtctgcctcg	gccagctctg	cctcggcctc	tccgctgctc	tactcggga	780
ccaccaatga	aacctctgtc	ttaccaatg	ccaatggcct	caacttcacc	cagatgaaca	840
ccaccctgcc	gaacgtgacc	attttcgcaa	cgggtaggtg	gaccgagtat	acctcaggta	900
gtgcgaccga	tagttaaccg	caactcagag	gtggtaccat	cgccggctcc	gattccagct	960
caaccgcccac	gaccggctac	acctccggag	cagtccgggt	cctgtccctc	atcgtatgcg	1020
tgccatccat	gctggatgtg	gccaatgttg	ccggcgtcca	ggtggccaac	gtgggaagcg	1080
aggatatcac	ctctgacatc	ctgatttcca	tgtccaagaa	gctgaaccgc	gttgtatgtg	1140
aggaccgac	catggccggg	gctgtcatca	cccacggcac	cgacaccctc	gaggagactg	1200
ccttcttct	ggacgccact	gtcaactgtg	gcaagccaat	tgctcatcgtg	ggtgccatgc	1260
gcccattccac	ggccattcca	gctgacgggc	ccttcaatct	gctcgaagcc	gtgacgggtg	1320
ctgctccac	gtcggcgcg	gatcgcggtg	ccatgggtgg	catgaacgat	cgcatgacct	1380
cggcctaacta	tgtgaccaag	accaatgcca	acactatgga	caccttcaag	gcccattgga	1440
tgggtacct	tgccgagatg	atctccaaca	ccccttctt	cttctacccg	cccgtcaagc	1500
caaccggtaa	ggtggccttt	gacatcacca	acgtgactga	gatccccctg	gtggacattc	1560
tgttttctta	tgaggacatg	cacaacgaca	ccctctacaa	cgccatctcc	agtggtgccc	1620
agggaattgt	ggtgagtgtg	atttccctga	tctctctcta	taaaacttgg	aatggacgct	1680
gatgagaata	gattgcccgg	gctggtgctg	gaggcgtcac	aacctccttc	aatgaggcta	1740
tcgaggatgt	catcaaccgt	ttggagatcc	ctgtcgtgca	gagtatgccc	acagtcaatg	1800
gggaagtgcc	actgtcagac	gtgagcagcg	acaccgccac	ccacatcgcc	agtggatacc	1860
taaaccgca	gaagtcccgc	attctgttgg	gattgctgct	atcccaggga	aagaatatca	1920
ccgaaatcgc	tgacgtgttt	gctctgggca	cggatgcgta	ggtgtcgata	gaaccattgt	1980
atataataat	gaccgabat	tatgatcatg	atagattgca	atagaaagtg	actggataca	2040
catcagcaaa	ggataccgag	ttttgccctc	aggegttcgt	agaaaaagtg	tatcctactg	2100
aagatcatga	atcatgtctt	atcttctggc	cccctcgtat	ccaggggtgt	ggacatgcag	2160
ggtgctttgc	gtctgaagga	tccgagatca	aattgacacg	agccagagtc	tgatacatcc	2220
ataatagtgg	gtatatttga	agtcacattga	tagtccttgt	ttgtgtcggg	caattgggtt	2280
agctagggcc	tggcttggtg	gcatactggt	ggactaatag	atggtagttc	aattaccgac	2340
gggactgtct	ccgcccatta	ttctcacaat	tcttatcagc	acattttccc	tgctgcgctt	2400
ggatctgcaa	tatttatttc	cctcgtcatc	acattcccac	gaaaagacca	tccagacatc	2460
ttgctcggtg	ttctggaccg	taagactggt	ttgaaaggca	aatgtaaagc	gtgatgggtc	2520
gacgtcaagc	ctgaccaatc	tagtaagctg	gtcttacttt	gggtgtagac	ggaggtatta	2580
ggtagtatta	aggcagctag	ttcgcctgca	ttaccaccca	ggcgaggcac	gccactgctg	2640
atcaggcgcg	aaatggaacg	aagtgcgagg	tccacttaac	atgatgcgcg	cggatactaa	2700
ggcgaccaag	accctggatt	gatcgtatg	attcgcggaa	cccgcgggtt	tcttcacggc	2760
tttcgataac	gcaggattgg	atcctcccag	cctcgtctct	gcaagtggga	ccctgaaggg	2820
ctctcctgca	cgtcattact	cagacactcc	catcttttgc	ttatttgcaa	tgaatcttat	2880
gggctgacct	tcagctcggc	gtgggatgcc	tgaatcgttg	gtgaaagtct	atlttgagcaa	2940
tcttagcctg	ctggtagagg	cggatgatta	taataatcaa	agcaccctat	cgtaaggatg	3000
aaggcttgtc	cctggccaac	catcactctg	gttattgact	agttgtgttt	gggagacagc	3060
tgaagcccat	tgtcggtaat	cgtccccaaa	gaatctgccc	ctgcatcatg	gagtcaggaa	3120
agaccgggtt	tcgcacggtc	gcagaaccgc	atccaacacg	tctagtagaa	ggaggggtag	3180
ggatactcat	ccgtctattg	tgtatatctg	caacgactaa	tgt		3223

<210> 2

<211> 1137

5 <212> ADN

<213> *Aspergillus niger*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1137)

ES 2 524 343 T3

<400> 2

atg cct ctc aag ccg att ctc ctg tct gcc ctg gcc agt ctc gcc tgg	48
Met Pro Leu Lys Pro Ile Leu Leu Ser Ala Leu Ala Ser Leu Ala Ser	
1 5 10 15	
gcc tct ccg ctg ctc tac tcg cgg acc acc aat gaa acc ttc gtc ttc	96
Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Ser Arg Thr Thr Asn Glu Thr Phe Val Phe	
20 25 30	
acc aat gcc aat ggc ctc aac ttc acc cag atg aac acc acc ctg ccg	144
Thr Asn Ala Asn Gly Leu Asn Phe Thr Gln Met Asn Thr Thr Leu Pro	
35 40 45	
aac gtg acc att ttc gca acg ggt ggt acc atc gcg ggc tcc gat tcc	192
Asn Val Thr Ile Phe Ala Thr Gly Gly Thr Ile Ala Gly Ser Asp Ser	
50 55 60	
agc tca acc gcc acg acc ggc tac acc tcc gga gca gtc ggg gtc ctg	240
Ser Ser Thr Ala Thr Thr Gly Tyr Thr Ser Gly Ala Val Gly Val Leu	
65 70 75 80	
tcc ctc atc gat gcg gtg cca tcc atg ctg gat gtg gcc aat gtt gcc	288
Ser Leu Ile Asp Ala Val Pro Ser Met Leu Asp Val Ala Asn Val Ala	
85 90 95	
ggc gtc cag gtg gcc aac gtg gga agc gag gat atc acc tct gac atc	336
Gly Val Gln Val Ala Asn Val Gly Ser Glu Asp Ile Thr Ser Asp Ile	
100 105 110	
ctg att tcc atg tcc aag aag ctg aac cgc gtt gta tgt gag gac ccg	384
Leu Ile Ser Met Ser Lys Lys Leu Asn Arg Val Val Cys Glu Asp Pro	
115 120 125	
acc atg gcc ggt gct gtc atc acc cac ggc acc gac acc ctc gag gag	432
Thr Met Ala Gly Ala Val Ile Thr His Gly Thr Asp Thr Leu Glu Glu	
130 135 140	
act gcc ttc ttc ctg gac gcc act gtc aac tgt ggc aag cca att gtc	480
Thr Ala Phe Phe Leu Asp Ala Thr Val Asn Cys Gly Lys Pro Ile Val	

ES 2 524 343 T3

```

145          150          155          160
atc gtg ggt gcc atg cgc cca tcc acg gcc atc tca gct gac ggg ccc      528
Ile Val Gly Ala Met Arg Pro Ser Thr Ala Ile Ser Ala Asp Gly Pro
          165          170          175
ttc aat ctg ctc gaa gcc gtg acg gtg gct gcc tcc acg tcg gcg cgc      576
Phe Asn Leu Leu Glu Ala Val Thr Val Ala Ala Ser Thr Ser Ala Arg
          180          185          190
gat cgc ggt gcc atg gtg gtc atg aac gat cgc att gcc tcg gcc tac      624
Asp Arg Gly Ala Met Val Val Met Asn Asp Arg Ile Ala Ser Ala Tyr
          195          200          205
tat gtg acc aag acc aat gcc aac act atg gac acc ttc aag gcc atg      672
Tyr Val Thr Lys Thr Asn Ala Asn Thr Met Asp Thr Phe Lys Ala Met
          210          215          220
gag atg ggc tac ctt ggc gag atg atc tcc aac acc cct ttc ttc ttc      720
Glu Met Gly Tyr Leu Gly Glu Met Ile Ser Asn Thr Pro Phe Phe Phe
          225          230          235          240
tac ccg ccc gtc aag cca acc ggt aag gtg gcc ttt gac atc acc aac      768
Tyr Pro Pro Val Lys Pro Thr Gly Lys Val Ala Phe Asp Ile Thr Asn
          245          250          255
gtg act gag atc ccc cgt gtg gac att ctg ttt tct tat gag gac atg      816
Val Thr Glu Ile Pro Arg Val Asp Ile Leu Phe Ser Tyr Glu Asp Met
          260          265          270
cac aac gac acc ctc tac aac gcc atc tcc agt ggt gcc cag gga att      864
His Asn Asp Thr Leu Tyr Asn Ala Ile Ser Ser Gly Ala Gln Gly Ile
          275          280          285
gtg att gcc ggg gct ggt gct gga ggc gtc aca acc tcc ttc aat gag      912
Val Ile Ala Gly Ala Gly Ala Gly Gly Val Thr Thr Ser Phe Asn Glu
          290          295          300
gct atc gag gat gtc atc aac cgt ttg gag atc cct gtc gtg cag agt      960
Ala Ile Glu Asp Val Ile Asn Arg Leu Glu Ile Pro Val Val Gln Ser
          305          310          315          320
atg cgc aca gtc aat ggg gaa gtg cca ctg tca gac gtg agc agc gac      1008
Met Arg Thr Val Asn Gly Glu Val Pro Leu Ser Asp Val Ser Ser Asp
          325          330          335
acc gcc acc cac atc gcc agt gga tac cta aac ccg cag aag tcc cgc      1056
Thr Ala Thr His Ile Ala Ser Gly Tyr Leu Asn Pro Gln Lys Ser Arg
          340          345          350
att ctg ttg gga ttg ctg cta tcc cag gga aag aat atc acc gaa atc      1104
Ile Leu Leu Gly Leu Leu Leu Ser Gln Gly Lys Asn Ile Thr Glu Ile
          355          360          365
gct gac gtg ttt gct ctg ggc acg gat gcg tag      1137
Ala Asp Val Phe Ala Leu Gly Thr Asp Ala
          370          375

```

<210> 3

<211> 378

<212> PRT

5 <213> *Aspergillus niger*

<400> 3

```

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

```

ES 2 524 343 T3

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

<210> 4

<211> 378

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ASN 01 (Mutado de *Aspergillus niger*)

<400> 4

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

ES 2 524 343 T3

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 Gly 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 Ser 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

<210> 5

<211> 378

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ASN 02 (Mutado de *Aspergillus niger*)

<400> 5

Met Pro Leu Lys Pro Ile Leu Leu Ser Ala Leu Ala Ser Leu Ala Ser
 1 5 10 15

ES 2 524 343 T3

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 Gly 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 Gly Ile
 100 105 110
 Leu Ile Ser Met Ser Lys Lys Leu Asn His 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 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

<210> 6

<211> 378

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ASN 03 (Mutado de *Aspergillus niger*)

<400> 6

ES 2 524 343 T3

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 Val 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 Ile 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

<210> 7

<211> 378

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ASN 04 (Mutado de *Aspergillus niger*)

<400> 7

ES 2 524 343 T3

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 Pro
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 Val 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

<210> 8

<211> 378

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ASN 05 (Mutado de *Aspergillus niger*)

<400> 8

ES 2 524 343 T3

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 Ile 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 Pro 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 Met Phe Ala Leu Gly Thr Asp Ala
 370 375

<210> 9

<211> 378

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ASN 06 (Mutado de *Aspergillus niger*)

<400> 9

ES 2 524 343 T3

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 Thr 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 Val 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

<210> 10

<211> 378

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ASN 07 (Mutado de *Aspergillus niger*)

<400> 10

ES 2 524 343 T3

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 Ile 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 Ala 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 Asp 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

<210> 11

<211> 378

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ASN 08 (Mutado de *Aspergillus niger*)

<400> 11

ES 2 524 343 T3

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 Tyr 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

<210> 12

5 <211> 378

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ASN 09 (Mutado de *Aspergillus niger*)

10 <400> 12

ES 2 524 343 T3

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 Pro 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
 Leu 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 Cys 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

<210> 13

<211> 378

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ASN 10 (Mutado de *Aspergillus niger*)

<400> 13

ES 2 524 343 T3

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 Asn 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

<210> 14

<211> 378

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ASN 11 (Mutado de *Aspergillus niger*)

<400> 14

ES 2 524 343 T3

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 Glu 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 Thr 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 His 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

<210> 15

<211> 378

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ASN 12 (Mutado de *Aspergillus niger*)

<400> 15

ES 2 524 343 T3

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 Val 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 Asn 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 His 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 Cys 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

<210> 16

<211> 378

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ASN 13 (Mutado de *Aspergillus niger*)

<400> 16

ES 2 524 343 T3

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 Tyr 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 Asn 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

<210> 17

<211> 378

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ASN 14 (Mutado de *Aspergillus niger*)

<400> 17

ES 2 524 343 T3

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 Asp 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 Val 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

<210> 18

<211> 378

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ASN 15 (Mutado de *Aspergillus niger*)

<400> 18

ES 2 524 343 T3

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 Lys Ala 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 Ser 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

<210> 19

<211> 378

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ASN16 (Mutado de *Aspergillus niger*)

<400> 19

ES 2 524 343 T3

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 Lys Ala 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 Pro 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 Ser Gly Ala Gly Ser Val Ser Thr Ser Phe Asn Glu
290 295 300
Ala Ile Glu Asp Val Ile Asn Arg Leu Glu Ile Pro Val Val Ala Ser
305 310 315 320
Thr Arg Thr Gly 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

REIVINDICACIONES

1. Una variante de polipéptido de asparaginasa que tiene al menos 80% de identidad con la secuencia polipeptídica como se expone en SEC ID NO: 3,
- 5 en el que la variante tiene una secuencia de aminoácidos que, cuando se alinea con la secuencia expuesta en SEC ID NO: 3, comprende al menos una sustitución de un resto de aminoácido que corresponde a cualquiera de los aminoácidos 53, 63, 66 u 88, definiéndose dichas posiciones con referencia a SEC ID NO: 3;
- y en el que la variante tiene una actividad específica que es mayor a al menos un pH que la del polipéptido como se expone en SEC ID NO: 3 medida al mismo pH, y/o en el que la variante tiene un óptimo de pH que es mayor que el del polipéptido como se expone en SEC ID NO: 3.
- 10 2. Una variante según la reivindicación 1, en la que la variante tiene una secuencia de aminoácidos que comprende al menos una sustitución de un resto de aminoácido que corresponde a cualquiera de las posiciones 63 u 88, definiéndose dichas posiciones con referencia a SEC ID NO: 3.
3. Una variante según la reivindicación 1 ó 2, en la que la variante tiene una actividad específica que es mayor, a al menos un pH entre pH 4 y pH 8, que la del polipéptido como se expone en SEC ID NO: 3 medida al mismo pH.
- 15 4. Una variante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la variante tiene una secuencia de aminoácidos que comprende uno o más de Tyr en la posición 53, Gly o Val o Ser en la posición 63, Pro en la posición 66, o Tyr o Pro en la posición 88, definiéndose dichas posiciones con referencia a SEC ID NO: 3.
5. Una variante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la variante tiene una secuencia de aminoácidos según una cualquiera de SEC ID NO: 4, SEC ID NO: 5, SEC ID NO: 6, SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 11, SEC ID NO: 12 o SEC ID NO: 16.
- 20 6. Una variante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además una o más sustituciones de restos de aminoácidos distintas de las definidas en la reivindicación 1.
7. Una secuencia de ácido nucleico que codifica la variante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. Un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la variante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 enlazada operablemente a una o más secuencias de control capaces de dirigir la expresión de una asparaginasa en un hospedante de expresión adecuado.
- 25 9. Un vector de expresión recombinante que comprende el constructo de ácido nucleico de la reivindicación 8.
10. Una célula hospedante recombinante que comprende el vector de expresión de la reivindicación 9.
11. Un método para producir una asparaginasa, que comprende cultivar la célula hospedante de la reivindicación 10 en condiciones que conduzcan a la producción de la asparaginasa, y recuperar la asparaginasa.
- 30 12. Un método para producir una variante de polipéptido de asparaginasa, método el cual comprende:
- a) seleccionar un polipéptido de asparaginasa progenitor que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID NO: 3;
- 35 b) sustituir al menos un resto de aminoácido que corresponde a cualquiera de 53, 63, 66 u 88, definiéndose dichas posiciones con referencia a SEC ID NO: 3;
- c) sustituir opcionalmente uno o más aminoácidos adicionales como se definen en b);
- d) preparar la variante que resulta de las etapas a)-c), en el que la variante tiene al menos 80% de identidad con SEC ID NO: 3;
- e) determinar la actividad específica a al menos un pH, y/o el óptimo de pH de la variante; y
- 40 f) seleccionar una variante que tiene una mayor actividad específica a al menos un pH en comparación con el polipéptido de asparaginasa progenitor, y/o un mayor óptimo de pH en comparación con el polipéptido de asparaginasa progenitor, para producir de ese modo una variante de polipéptido de asparaginasa.
13. Un método según la reivindicación 12, en el que, en la etapa b), se sustituye al menos un resto de aminoácido que corresponde a cualquiera de 63 u 88, definiéndose dichas posiciones con referencia a SEC ID NO: 3.
- 45 14. Un método según la reivindicación 12 ó 13, en el que, en la etapa b), el resto de aminoácido sustituido corresponde a uno o más de Tyr en la posición 53, Gly o Val o Ser en la posición 63, Pro en la posición 66, o Tyr o Pro en la posición 88, definiéndose dichas posiciones con referencia a SEC ID NO: 3.

15. Una composición que comprende la variante según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o la asparaginasa obtenible mediante un método según la reivindicación 11 a 14.
16. Uso de una asparaginasa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o de una composición según la reivindicación 15, en la producción de un producto alimentario.
- 5 17. Uso de una asparaginasa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o de una composición según la reivindicación 15, para reducir la cantidad de acrilamida formada en un producto alimentario procesado térmicamente, basado en una materia prima que contiene asparagina.
- 10 18. Procedimiento para la producción de un producto alimentario que implica al menos una etapa de calentamiento, que comprende añadir una o más enzimas asparaginasas según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o una composición según la reivindicación 15, a una forma intermedia de dicho producto alimentario en dicho procedimiento de producción, con lo que se añade la enzima antes de dicha etapa de calentamiento en una cantidad que es eficaz para reducir el nivel de asparagina que está presente en dicha forma intermedia de dicho producto alimentario.