

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 362**

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 08736346 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2015 EP 2137306**

54 Título: **Nuevas asparaginasas y usos de las mismas**

30 Prioridad:

20.04.2007 EP 07106662

20.04.2007 EP 07106660

20.04.2007 EP 07106664

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

06.11.2015

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

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 550 362 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

Nuevas asparaginasas y usos de las mismas

Campo de la invención

5 La invención se refiere a variantes de polipéptidos de asparaginasa recientemente identificadas y a secuencias de polinucleótidos que comprenden genes que codifican estas nuevas asparaginasas. La invención presenta la secuencia de aminoácidos de la proteína funcional de longitud completa y equivalentes funcionales del gen o la secuencia de aminoácidos. La invención se refiere también a métodos de utilizar estas proteínas variantes en procesos industriales. También se incluyen en la invención células transformadas con un polinucleótido de acuerdo con la invención adecuado para la producción de estas proteínas y células. La invención se refiere también a métodos de utilizar estas proteínas en procesos industriales.

Antecedentes de la invención

15 Recientemente, se publicó la aparición de acrilamida en un cierto número de productos alimenticios calentados (Tareke et al. Chem. Res. Toxicol. 13, 517-522 (2000)). Dado que la acrilamida se considera como probablemente cancerígena para animales y seres humanos, este hallazgo ha dado lugar a una preocupación en todo el mundo. La investigación adicional reveló que cantidades considerables de acrilamida son detectables en una diversidad de alimentos comunes asados, fritos y preparados al horno, y se demostró que la presencia de acrilamida en los alimentos es el resultado del proceso de calentamiento.

20 Una vía para la formación de acrilamida a partir de aminoácidos y azúcares reductores, como resultado de la reacción de Maillard ha sido propuesto por Mottram et al. Nature 419: 448 (2002). De acuerdo con esta hipótesis, se puede formar acrilamida durante la reacción de Maillard. Durante el asado o tostado, la reacción de Maillard es la principal responsable del color, olor y sabor. Una reacción asociada con Maillard es la degradación de Strecker de aminoácidos y se propuso una vía a la acrilamida. La formación de acrilamida se convirtió en detectable cuando la temperatura excedía de 120°C, y la tasa de formación más alta se observó en torno a 170°C. Cuando estaban presentes asparagina y glucosa, se pudieron observar los niveles más altos de acrilamida, mientras que glutamina y ácido aspártico sólo resultaron en cantidades traza.

25 El límite de migración oficial en la UE para la migración de acrilamida en los alimentos a partir de plásticos en contacto con alimentos se ha fijado en 10 ppb (10 microgramos por kilogramo). Aunque aún no se ha fijado un límite oficial para la acrilamida que se forma durante la cocción, el hecho de que una gran cantidad de productos que supere este valor, especialmente cereales, productos de pan y productos a base de patata o de maíz, es motivo de preocupación.

30 Se conocen varias materias primas vegetales que contienen niveles sustanciales de asparagina. En patatas, asparagina es el aminoácido libre dominante (940 mg/kg, correspondiente a 40% del contenido total de aminoácidos) y en la harina de trigo, la asparagina está presente a un nivel de aproximadamente 167 mg/kg, correspondiente al 14% de la agrupación total de aminoácidos libres (Belitz y Grosch en Food Chemistry – Springer Nueva York, 1999). El hecho de que la acrilamida se forme principalmente a partir de asparagina (combinado con azúcares reductores) puede explicar los altos niveles de acrilamida en productos vegetales fritos, cocidos al horno o asados. Por lo tanto, en interés de la salud pública, existe una necesidad urgente de productos alimenticios que tengan niveles sustancialmente más bajos de acrilamida o, preferiblemente, carezcan de ella.

35 Se ha propuesto una diversidad de soluciones para disminuir el contenido de acrilamida, ya sea mediante la alteración de las variables de procesamiento, p. ej., la temperatura o la duración de la etapa de calentamiento, o química o enzimáticamente evitando la formación de acrilamida o eliminando la acrilamida formada.

40 En varias solicitudes de patente se ha descrito el uso de asparaginasa para reducir el nivel de asparagina y, con ello, la cantidad de acrilamida formada. Asparaginasas adecuadas para este fin se han producido a partir de varias fuentes fúngicas tal como, por ejemplo, *Aspergillus niger* en el documento WO2004/030468 y *Aspergillus oryzae* en el documento WO04/032648.

45 Aunque todas las L-asparaginasas catalizan la misma conversión química, esto no significa que sean adecuadas para las mismas aplicaciones. Diversas aplicaciones exigirán diferentes demandas sobre las condiciones bajo las cuales las enzimas tienen que operar. 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 pueden tener un efecto negativo sobre la estabilidad de la enzima), el contenido de humedad, el pH, la concentración de sal, la integridad estructural de la matriz del alimento, la presencia de activadores o inhibidores de la enzima, la concentración del sustrato y de los productos, etc.

Por lo tanto existe una necesidad continua de mejorar las asparaginasa para varias aplicaciones que tienen propiedades mejoradas.

Objeto de la invención

5 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 producen tales variantes de asparaginasa. También son parte de la descripción polipéptidos de fusión, así como métodos para fabricar y utilizar los polinucleótidos y polipéptidos de acuerdo con la invención.

Compendio de la invención

10 La invención proporciona nuevas variantes de polipéptidos que tienen actividad de asparaginasa. En particular, la invención proporciona una asparaginasa variante que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4, y variantes adicionales de la misma que tiene al menos un 90% de homología con al menos una de ellas. Típicamente, tales variantes adicionales de la invención serán equivalentes funcionales del polipéptido de una cualquiera de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4. La expresión "equivalente funcional" pretende en esta memoria requerir que tales polipéptidos equivalentes funcionales tengan al menos actividad de asparaginasa.

15 La presente descripción proporciona una asparaginasa que tiene la anchura del perfil de actividad de pH que es al menos 3,5, preferiblemente al menos 4, más preferiblemente al menos 5 unidades de pH. En el contexto de la presente invención, la anchura del perfil de actividad de pH es la anchura del intervalo de pHs (calculada en unidades de pH) en donde la enzima exhibe el 50 a 100% de su actividad máxima. La anchura del perfil de actividad de pH de la enzima se puede calcular como se indica en los ejemplos. La asparaginasa que tiene la anchura del perfil de actividad de pH que es al menos 3,5 se puede aislar de fuentes naturales o puede ser una enzima asparaginasa artificial. En una realización preferida, la asparaginasa que tiene la anchura del perfil de actividad de pH que es al menos 3,5, preferiblemente al menos 4, más preferiblemente al menos 5 unidades de pH de ancho, es una asparaginasa de acuerdo con una asparaginasa variante que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en cualquiera de las SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4, y otras variantes de las mismas que tienen al menos un 85% de homología con al menos una de ellas.

20 En una realización, la descripción proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido con una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4 o una variante, por ejemplo, un equivalente funcional de cualquiera de ellos.

25 En una realización adicional, la descripción proporciona un polinucleótido aislado que codifica al menos un dominio funcional de un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4 o una variante, por ejemplo un equivalente funcional de cualquiera de ellos.

Además, la invención proporciona nuevos polinucleótidos que codifican las nuevas variantes de polipéptidos de acuerdo con la invención.

35 Además, la invención proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica la asparaginasa que tiene la anchura del perfil de actividad de pH que es al menos 4, preferiblemente al menos 5 unidades de pH.

La descripción también se refiere a vectores que comprenden una secuencia de polinucleótido según la invención y cebadores, sondas y fragmentos que se pueden utilizar para amplificar o detectar tal polinucleótido de acuerdo con la invención.

40 En una realización preferida adicional, se proporciona un vector en el que una secuencia de polinucleótido de acuerdo con la invención está enlazada funcionalmente con al menos una secuencia reguladora adecuada para la expresión de la secuencia de aminoácidos codificada en una célula huésped adecuada tal como un hongo filamentoso, por ejemplo *Aspergillus*. La descripción también proporciona métodos para preparar polinucleótidos y vectores de acuerdo con la invención.

45 La invención también se refiere a células huésped producidas de forma recombinante que contienen polinucleótidos variantes (heterólogos) de acuerdo con la invención.

En otra realización, la descripción proporciona células huésped recombinantes en las que la expresión de una asparaginasa variante de acuerdo con la invención se incrementa significativamente o en las que se incrementa la actividad de la asparaginasa producida.

50 En otra realización, la invención proporciona una célula huésped producida de forma recombinante que contiene un polinucleótido de acuerdo con la invención y, por consiguiente, en donde la célula es capaz de producir una asparaginasa variante funcional de acuerdo con la invención, preferiblemente una célula capaz de sobre-expresar la

asparaginasa variante de acuerdo con la invención, por ejemplo una cepa de *Aspergillus niger* que comprende un polinucleótido de acuerdo con la invención.

5 En aún otro aspecto, se proporciona un polipéptido variante purificado. Los polipéptidos de acuerdo con la descripción incluyen los polipéptidos codificados por los polinucleótidos de acuerdo con la invención. Especialmente preferido es un polipéptido variante de acuerdo con una cualquiera de las SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4 o una variante, por ejemplo, un equivalente funcional, de cualquiera de ellas.

Las proteínas de fusión que comprenden un polipéptido de acuerdo con la invención también están dentro del alcance de la descripción.

La invención también proporciona métodos de fabricación de los polipéptidos variantes de acuerdo con la invención.

10 La descripción también se refiere al uso de la asparaginasa variante de acuerdo con la invención en cualquier proceso industrial tal como se describe en esta memoria.

Descripción de la Figura

FIG. 1. Alineación de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4 con Asparaginasa de *A. niger* de tipo salvaje según se describe en SEQ ID NO: 3 del documento WO2004/030468.

15 Descripción detallada de la invención

A lo largo de la presente memoria descriptiva y reivindicaciones adjuntas, las palabras "comprenden" e "incluyen" y variaciones tales como "comprende", "que comprende", "incluye" e "incluyendo" se han de interpretar de modo inclusive. Es decir, estas palabras tienen como objetivo transmitir la posible inclusión de otros elementos o números enteros no recogidos específicamente, cuando el contexto lo permite.

20 La presente descripción se refiere a una secuencia de asparaginasa variante que tiene la secuencia indicada en una cualquiera de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4 y a variantes adicionales de las mismas.

A continuación, se recogen aspectos específicos para las dos secuencias de polipéptidos.

25 La secuencia de SEQ ID NO: 2 comprende las siguientes sustituciones en comparación con una secuencia de asparaginasa de tipo salvaje obtenida de *Aspergillus niger* según se describe en el documento WO 2004/030468: T25A, E28T, F30Y, A35S, F53L, D63S, S64A, S65D, S66N, S74A, V77I, V79I, L80Q, S81T, S88E, E106P, I108V, D111S, I114L, S117A, K119T, R122E, E126D, A131S, I161V, S168A, E181Q, T189P, S190A, M197L, A205V, Y208F, V210A, T211S, M224V, Y228N, E231A, M232I, I233V, T236K, F238Y, F240Y, V250T, A251T, F252V, I254V, T255R, E259S, F267Y, E270Q, H273Q, N279S, S282D, S283N, Q286K, A293S, G297S, T299S, S301G, N303S, E304D, E307D, V309I, I310A, N311S, R312K, L313H, E314S, V317I, Q319L, M321T, V324G, L330T, Y345F, 30 S351A, S360A, Q361E, N364G, I365F, T366K, A369R, D370E, L374K, G375V y D377V.

La secuencia de asparaginasa de tipo salvaje obtenida de *A. niger* según se describe en el documento WO 2004/030468 se describe en ella como SEQ ID NO: 3 (secuencia de aminoácidos). La asparaginasa expuesta en la SEQ ID NO: 2 de la presente solicitud se denomina provisionalmente ASN001.

35 Una variante de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2, por ejemplo un equivalente funcional, puede comprender uno o más de Ala en la posición 25, Thr en la posición 28, Tyr en la posición 30, Ser en la posición 35, Leu en la posición 53, Ser en la posición 63, Ala en la posición 64, Asp en la posición 65, Asn en la posición 66, Ala en la posición 74, Ile en la posición 77, Ile en la posición 79, Gln en la posición 80, Thr en la posición 81, Glu en la posición 88, Pro en la posición 106, Val en la posición 108, Ser en la posición 111, Leu en la posición 114, Ala en la posición 117, Thr en la posición 119, Glu en la posición 122, Asp en la posición 126, Ser en la posición 131, Val en la posición 161, Ala en la posición 168, Gln en la posición 181, Pro en la posición 189, Ala en la posición 190, Leu en la posición 197, Val en la posición 205, Phe en la posición 208, Ala en la posición 210, Ser en la posición 211, Val en la posición 224, Asn en la posición 228, Ala en la posición 231, Ile en la posición 232, Val en la posición 233, Lys en la posición 236, Tyr en la posición 238, Tyr en la posición 240, Thr en la posición 250, Thr en la posición 251, Val en la posición 252, Val en la posición 254, Arg en la posición 255, Ser en la posición 259, Tyr en la posición 267, Gln en la posición 270, Gln en la posición 273, Ser en la posición 279, Asp en la posición 282, Asn en la posición 283, Lys en la posición 286, Ser en la posición 293, Ser en la posición 297, Ser en la posición 299, Gly en la posición 301, Ser en la posición 303, Asp en la posición 304, Asp en 307, Ile en la posición 309, Ala en la posición 310, Ser en la posición 311, Lys en la posición 312, His en la posición 313, Ser en la posición 314, Ile en la posición 317, Leu en la posición 319, Thr en la posición 321, Gly en la posición 324, Thr en la posición 330, Phe en la posición 345, Ala en la posición 351, Ala en la posición 360, Glu en la posición 361, Gly en la posición 364, Phe en la posición 365, Lys en la posición 366, Arg en la posición 369, Glu en la posición 370, Lys en la posición 374, Val en la posición 375 o Val en la posición 377, estando dichas posiciones definidas con referencia a SEQ ID NO: 2.

50

la variante) correspondiente a la posición 375 en SEQ ID NO: 2; o Val en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 377 en la SEQ ID NO: 2.

5 Un polipéptido de asparaginasa variante de la invención puede comprender dos, tres, cuatro, cinco, por ejemplo al menos 10, al menos 15, al menos 20 tal como al menos 25, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80 o la totalidad de los siguientes aminoácidos: Ala en la posición 25, Thr en la posición 28, Tyr en la posición 30, Ser en la posición 35, Leu en la posición 53, Ser en la posición 63, Ala en posición 64, Asp en la posición 65, Asn en la posición 66, Ala en la posición 74, Ile en la posición 77, Ile en la posición 79, Gln en la posición 80, Thr en la posición 81, Glu en la posición 88, Pro en la posición 106, Val en la posición 108, Ser en la posición 111, Leu en la posición 114, Ala en la posición 117, Thr en la posición 119, Glu en la posición 122, Asp en la posición 126, Ser en la posición 131, Val en la posición 161, Ala en la posición 168, Gln en la posición 181, Pro en la posición 189, Ala en la posición 190, Leu en la posición 197, Val en la posición 205, Phe en la posición 208, Ala en la posición 210, Ser en la posición 211, Val en la posición 224, Asn en la posición 228, Ala en la posición 231, Ile en la posición 232, Val en la posición 233, Lys en la posición 236, Tyr en la posición 238, Tyr en la posición 240, Thr en la posición 250, Thr en la posición 251, Val en la posición 252, Val en la posición 254, Arg en la posición 255, Ser en la posición 259, Tyr en la posición 267, Gln en la posición 270, Gln en la posición 273, Ser en la posición 279, Asp en la posición 282, Asn en la posición 283, Lys en la posición 286, Ser en la posición 293, Ser en la posición 297, Ser en la posición 299, Gly en la posición 301, Ser en la posición 303, Asp en la posición 304, Asp en 307, Ile en la posición 309, Ala en la posición 310, Ser en la posición 311, Lys en la posición 312, His en la posición 313, Ser en la posición 314, Ile en la posición 317, Leu en la posición 319, Thr en la posición 321, Gly en la posición 324, Thr en la posición 330, Phe en la posición 345, Ala en la posición 351, Ala en la posición 360, Glu en la posición 361, Gly en la posición 364, Phe en la posición 365, Lys en la posición 366, Arg en la posición 369, Glu en la posición 370, Lys en la posición 374, Val en la posición 375 o Val en la posición 377, estando dichas posiciones definidas con referencia a SEQ ID NO: 2.

25 Por consiguiente, un polipéptido de asparaginasa variante de la invención puede comprender cualquier combinación de dos de más de Ala en la posición 25, Thr en la posición 28, Tyr en la posición 30, Ser en la posición 35, Leu en la posición 53, Ser en la posición 63, Ala en la posición 64, Asp en la posición 65, Asn en la posición 66, Ala en la posición 74, Ile en la posición 77, Ile en la posición 79, Gln en la posición 80, Thr en la posición 81, Glu en la posición 88, Pro en la posición 106, Val en la posición 108, Ser en la posición 111, Leu en la posición 114, Ala en la posición 117, Thr en la posición 119, Glu en la posición 122, Asp en la posición 126, Ser en la posición 131, Val en la posición 161, Ala en la posición 168, Gln en la posición 181, Pro en la posición 189, Ala en la posición 190, Leu en la posición 197, Val en la posición 205, Phe en la posición 208, Ala en la posición 210, Ser en la posición 211, Val en la posición 224, Asn en la posición 228, Ala en la posición 231, Ile en la posición 232, Val en la posición 233, Lys en la posición 236, Tyr en la posición 238, Tyr en la posición 240, Thr en la posición 250, Thr en la posición 251, Val en la posición 252, Val en la posición 254, Arg en la posición 255, Ser en la posición 259, Tyr en la posición 267, Gln en la posición 270, Gln en la posición 273, Ser en la posición 279, Asp en la posición 282, Asn en la posición 283, Lys en la posición 286, Ser en la posición 293, Ser en la posición 297, Ser en la posición 299, Gly en la posición 301, Ser en la posición 303, Asp en la posición 304, Asp en 307, Ile en la posición 309, Ala en la posición 310, Ser en la posición 311, Lys en la posición 312, His en posición 313, Ser en la posición 314, Ile en la posición 317, Leu en la posición 319, Thr en la posición 321, Gly en la posición 324, Thr en la posición 330, Phe en la posición 345, Ala en la posición 351, Ala en la posición 360, Glu en la posición 361, Gly en la posición 364, Phe en la posición 365, Lys en la posición 366, Arg en la posición 369, Glu en la posición 370, Lys en la posición 374, Val en la posición 375 o Val en la posición 377, estando dichas posiciones definidas con referencia a SEQ ID NO: 2.

45 Preferiblemente, un polipéptido asparaginasa variante de la descripción puede comprender todos Ala en la posición 25, Thr en la posición 28, Tyr en la posición 30, Ser en la posición 35, Leu en la posición 53, Ser en la posición 63, Ala en la posición 64, Asp en la posición 65, Asn en la posición 66, Ala en la posición 74, Ile en la posición 77, Ile en la posición 79, Gln en la posición 80, Thr en la posición 81, Glu en la posición 88, Pro en la posición 106, Val en la posición 108, Ser en la posición 111, Leu en la posición 114, Ala en la posición 117, Thr en la posición 119, Glu en la posición 122, Asp en la posición 126, Ser en la posición 131, Val en la posición 161, Ala en la posición 168, Gln en la posición 181, Pro en la posición 189, Ala en la posición 190, Leu en la posición 197, Val en la posición 205, Phe en la posición 208, Ala en la posición 210, Ser en la posición 211, Val en la posición 224, Asn en la posición 228, Ala en la posición 231, Ile en la posición 232, Val en la posición 233, Lys en la posición 236, Tyr en la posición 238, Tyr en la posición 240, Thr en la posición 250, Thr en la posición 251, Val en la posición 252, Val en la posición 254, Arg en la posición 255, Ser en la posición 259, Tyr en la posición 267, Gln en la posición 270, Gln en la posición 273, Ser en la posición 279, Asp en la posición 282, Asn en la posición 283, Lys en la posición 286, Ser en la posición 293, Ser en la posición 297, Ser en la posición 299, Gly en la posición 301, Ser en la posición 303, Asp en la posición 304, Asp en 307, Ile en la posición 309, Ala en la posición 310, Ser en la posición 311, Lys en la posición 312, His en la posición 313, Ser en la posición 314, Ile en la posición 317, Leu en la posición 319, Thr en la posición 321, Gly en la posición 324, Thr en la posición 330, Phe en la posición 345, Ala en la posición 351, Ala en la posición 360, Glu en la posición 361, Gly en la posición 364, Phe en la posición 365, Lys en la posición 366, Arg en la posición 369, Glu en la posición 370, Lys en la posición 374, Val en la posición 375 o Val en la posición 377, estando dichas posiciones definidas con referencia a SEQ ID NO: 2.

5 Aquellas posiciones en un polipéptido de asparaginasa variante de la descripción que corresponden a las posiciones 25, 28, 30, 35, 53, 63, 64, 65, 66, 74, 77, 79, 80, 81, 88, 106, 108, 111, 114, 117, 119, 122, 126, 131, 161, 168, 181, 189, 190, 197, 205, 208, 210, 211, 224, 228, 231, 232, 233, 236, 238, 240, 250, 251, 252, 254, 255, 259, 267, 270, 273, 279, 282, 283, 286, 293, 297, 299, 301, 303, 304, 307, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 317, 319, 321, 324, 330, 345, 351, 360, 361, 364, 365, 366, 369, 370, 374, 375 y 377 pueden ser identificadas mediante el alineamiento de la secuencia del polipéptido variante con la de SEQ ID NO: 2 utilizando, por ejemplo, el alineamiento GAP a la secuencia más homóloga encontrada por el programa GAP (véase más abajo para más detalles de este programa). Las posiciones en la variante correspondiente a las posiciones 25, 28, 30, 35, 53, 63, 64, 65, 66, 74, 77, 79, 80, 81, 88, 106, 108, 111, 114, 117, 119, 122, 126, 131, 161, 168, 181, 189, 190, 197, 205, 208, 210, 211, 224, 228, 231, 232, 233, 236, 238, 240, 250, 251, 252, 254, 255, 259, 267, 270, 273, 279, 282, 283, 286, 293, 297, 299, 301, 303, 304, 307, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 317, 319, 321, 324, 330, 345, 351, 360, 361, 364, 365, 366, 369, 370, 374, 375 y 377 en SEQ ID NO: 2 pueden así ser identificadas y se las alude como las posiciones definidas con referencia a SEQ ID NO: 2.

15 La secuencia de la SEQ ID NO: 4 comprende las siguientes sustituciones en comparación con una secuencia de asparaginasa de tipo salvaje obtenida de *Aspergillus niger* según se describe en el documento WO 2004/030468: A35S, F53L, D63S, S64A, S65D, S66N, S74A, V77I, V79I, L80Q, S81T, S88E, E106P, I108V, D111S, I114L, S117A, K119T, R122E, E126D, I161V, S168A, E181Q, T189P, S190A, M197L, A205V, Y208F, T211S, M224V, Y228N, E231A, M232I, I233V, T236K, F238Y, V250T, A251T, I254V, T255R, E259S, F267Y, E270Q, N279D, S282D, S283N, Q286K, A293S, G297S, T299S, T300S, S301G, N303S, E304D, V309I, N311S, R312T, L313H, E314S, V317I, M321T, V324G, L330P, V333E, H340Q, Y345F, S360A, N364G, T366E, A369R, D370E, L374K, G375V, T376G y D377V.

25 Además, la secuencia de SEQ ID NO: 4 comprende una delección de cuatro aminoácidos en comparación con la secuencia de asparaginasa de tipo salvaje obtenido a partir de *Aspergillus niger* según se describe en el documento WO 2004/030468, es decir, SEQ ID NO: 4 descrita en esta memoria no comprende aminoácidos que correspondan a D336, T337, A338 y T339 en la secuencia de asparaginasa de tipo salvaje obtenido de *Aspergillus niger* según se describe en el documento WO 2004/030468 y en el que se hace referencia como SEQ ID NO: 3 (secuencia de aminoácidos). La asparaginasa expuesta en SEQ ID NO: 4 de la presente solicitud se denomina provisionalmente ASN002.

30 Una variante de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 4, por ejemplo, un equivalente funcional, puede comprender uno o más de Ser en la posición 35, Leu en la posición 53, Ser en la posición 63, Ala en la posición 64, Asp en la posición 65, Asn en la posición 66, Ala en la posición 74, Ile en la posición 79, Gln en la posición 80, Thr en la posición 81, Glu en la posición 88, Pro en la posición 106, Val en la posición 108, Ser en la posición 111, Leu en la posición 114, Ala en la posición 117, Thr en la posición 119, Glu en la posición 122, Asp en la posición 126, Val en la posición 161, Ala en la posición 168, Gln en la posición 181, Pro en la posición 189, Ala en la posición 190, Leu en la posición 197, Val en la posición 205, Phe en la posición 208, Ser en la posición 211, Val en la posición 224, Asn en la posición 228, Ala en la posición 231, Ile en la posición 232, Val en la posición 233, Lys en la posición 236, Tyr en la posición 238, Thr en la posición 250, Thr en la posición 251, Val en la posición 254, Arg en la posición 255, Ser en la posición 259, Tyr en la posición 267, Gln en la posición 270, Asp en la posición 279, Asp en la posición 282, Asn en la posición 283, Lys en la posición 286, Ser en la posición 293, Ser en la posición 297, Ser en la posición 299, Ser en la posición 300, Gly en la posición 301, Ser en la posición 303, Asp en la posición 304, Ile en la posición 309, Ser en la posición 311, Thr en la posición 312, His en la posición 313, Ser en la posición 314, Ile en la posición 317, Thr en la posición 321, Gly en la posición 324, Pro en la posición 330, Glu en la posición 333, Gln en la posición 336, Phe en la posición 341, Ala en la posición 356, Gly en la posición 360, Glu en la posición 362, Arg en la posición 365, Glu en la posición 366, Lys en la posición 370, Val en la posición 371, Gly en la posición 372 o Val en la posición 373, estando dichas posiciones definidas con referencia a SEQ ID NO: 4.

Es decir, cuando una variante de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 4 se alinea con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 4, la variante puede comprender uno o más de:

50 Ser en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 35 en SEQ ID NO: 4; Leu en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 53 en SEQ ID NO: 4; Ser en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 63 en SEQ ID NO: 4; Ala en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 64 en SEQ ID NO: 4; Asp en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 65 en SEQ ID NO: 4; Asn en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 66 en SEQ ID NO: 4; Ala en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 74 en SEQ ID NO: 4; Ile en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 77 en SEQ ID NO: 4; Ile en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 79 en SEQ ID NO: 4; Gln en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 80 en SEQ ID NO: 4; Thr en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 81 en SEQ ID NO: 4; Glu en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 88 en SEQ ID NO: 4; Pro en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 106 en SEQ ID NO: 4; Val en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 108 en SEQ ID NO: 4; Ser en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 111 en SEQ ID NO: 4; Leu en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 114 en SEQ ID NO: 4; Ala en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 117 en SEQ ID NO: 4; Thr en la posición (en la variante) que corresponde a la posición 119 en SEQ ID NO: 4; Glu en la posición (en la variante) correspondiente a

5 la posición 122 en SEQ ID NO: 4; Asp en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 126 en SEQ ID NO: 4; Val en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 161 en SEQ ID NO: 4; Ala en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 168 en SEQ ID NO: 4; Gln en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 181 en la SEQ ID NO: 4; Pro en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 189 en SEQ ID NO: 4; Ala en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 190 en SEQ ID NO: 4; Leu en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 197 en SEQ ID NO: 4; Val en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 205 en SEQ ID NO: 4; Phe en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 208 en SEQ ID NO: 4; Ser en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 211 en SEQ ID NO: 4; Val en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 224 en SEQ ID NO: 4; Asn en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 228 en SEQ ID NO: 4; Ala en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 231 en SEQ ID NO: 4; Ile en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 232 en SEQ ID NO: 4; Val en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 233 en SEQ ID NO: 4; Lys en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 236 en SEQ ID NO: 4; Tyr en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 238 en SEQ ID NO: 4; Thr en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 250 en SEQ ID NO: 4; Thr en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 251 en SEQ ID NO: 4; Val en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 254 en SEQ ID NO: 4; Arg en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 255 en SEQ ID NO: 4; Ser en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 259 en SEQ ID NO: 4; Tyr en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 267 en SEQ ID NO: 4; Gln en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 270 en SEQ ID NO: 4; Asp en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 279 en SEQ ID NO: 4; Asp en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 282 en SEQ ID NO: 4; Asn en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 283 en SEQ ID NO: 4; Lys en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 286 en SEQ ID NO: 4; Ser en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 293 en SEQ ID NO: 4; Ser en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 297 en SEQ ID NO: 4; Ser en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 299 en SEQ ID NO: 4; Ser en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 300 en SEQ ID NO: 4; Gly en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 301 en SEQ ID NO: 4; Ser en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 303 en SEQ ID NO: 4; Asp en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 304 en SEQ ID NO: 4; Ile en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 309 en SEQ ID NO: 4; Ser en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 311 en SEQ ID NO: 4; Thr en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 312 en SEQ ID NO: 4; His en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 313 en SEQ ID NO: 4; Ser en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 314 en SEQ ID NO: 4; Ile en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 317 en SEQ ID NO: 4; Thr en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 321 en SEQ ID NO: 4; Gly en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 324 en SEQ ID NO: 4; Pro en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 330 en SEQ ID NO: 4; Glu en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 333 en SEQ ID NO: 4; Gln en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 336 en SEQ ID NO: 4; Phe en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 341 en SEQ ID NO: 4; Ala en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 356 en SEQ ID NO: 4; Gly en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 360 en SEQ ID NO: 4; Glu en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 362 en SEQ ID NO: 4; Arg en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 365 en SEQ ID NO: 4; Glu en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 366 en SEQ ID NO: 4; Lys en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 370 en SEQ ID NO: 4; Val en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 371 en SEQ ID NO: 4; Gly en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 372 en SEQ ID NO: 4; o Val en la posición (en la variante) correspondiente a la posición 373 en SEQ ID NO: 4.

45 Un polipéptido de asparaginasa variante de la invención puede comprender dos, tres, cuatro, cinco, por ejemplo al menos 10, al menos 15, al menos 20 tal como al menos 25, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70 o la totalidad de los siguientes aminoácidos: Ser en la posición 35, Leu en la posición 53, Ser en la posición 63, Ala en la posición 64, Asp en la posición 65, Asn en la posición 66, Ala en la posición 74, Ile en la posición 77, Ile en la posición 79, Gln en la posición 80, Thr en la posición 81, Glu en la posición 88, Pro en la posición 106, Val en la posición 108, Ser en la posición 111, Leu en la posición 114, Ala en la posición 117, Thr en la posición 119, Glu en la posición 122, Asp en la posición 126, Val en la posición 161, Ala en la posición 168, Gln en la posición 181, Pro en la posición 189, Ala en la posición 190, Leu en la posición 197, Val en la posición 205, Phe en la posición 208, Ser en la posición 211, Val en la posición 224, Asn en la posición 228, Ala en la posición 231, Ile en la posición 232, Val en la posición 233, Lys en la posición 236, Tyr en la posición 238, Thr en la posición 250, Thr en la posición 251, Val en la posición 254, Arg en la posición 255, Ser en la posición 259, Tyr en la posición 267, Gln en la posición 270, Asp en la posición 279, Asp en la posición 282, Asn en la posición 283, Lys en la posición 286, Ser en la posición 293, Ser en la posición 297, Ser en la posición 299, Ser en la posición 300, Gly en la posición 301, Ser en la posición 303, Asp en la posición 304, Ile en la posición 309, Ser en la posición 311, Thr en la posición 312, His en la posición 313, Ser en la posición 314, Ile en la posición 317, Thr en la posición 321, Gly en la posición 324, Pro en la posición 330, Glu en la posición 333, Gln en la posición 336, Phe en la posición 341, Ala en la posición 356, Gly en la posición 360, Glu en la posición 362, Arg en la posición 365, Glu en la posición 366, Lys en la posición 370, Val en la posición 371, Gly en la posición 372 o Val en la posición 373, estando dichas posiciones definidas con referencia a SEQ ID NO: 4.

Por consiguiente, un polipéptido de asparaginasa variante de la descripción puede comprender cualquier combinación de dos de más de Ser en la posición 35, Leu en la posición 53, Ser en la posición 63, Ala en la posición 64, Asp en la posición 65, Asn en la posición 66, Ala en la posición 74, Ile en la posición 77, Ile en la posición 79, Gln en la posición 80, Thr en la posición 81, Glu en la posición 88, Pro en la posición 106, Val en la posición 108, Ser en la posición 111, Leu en la posición 114, Ala en la posición 117, Thr en la posición 119, Glu en la posición 122, Asp en la posición 126, Val en la posición 161, Ala en la posición 168, Gln en la posición 181, Pro en la posición 189, Ala en la posición 190, Leu en la posición 197, Val en la posición 205, Phe en la posición 208, Ser en la posición 211, Val en la posición 224, Asn en la posición 228, Ala en la posición 231, Ile en la posición 232, Val en la posición 233, Lys en la posición 236, Tyr en la posición 238, Thr en la posición 250, Thr en la posición 251, Val en la posición 254, Arg en la posición 255, Ser en la posición 259, Tyr en la posición 267, Gln en la posición 270, Asp en la posición 279, Asp en la posición 282, Asn en la posición 283, Lys en la posición 286, Ser en la posición 293, Ser en la posición 297, Ser en la posición 299, Ser en la posición 300, Gly en la posición 301, Ser en la posición 303, Asp en la posición 304, Ile en la posición 309, Ser en la posición 311, Thr en la posición 312, His en la posición 313, Ser en la posición 314, Ile en la posición 317, Thr en la posición 321, Gly en la posición 324, Pro en la posición 330, Glu en la posición 333, Gln en la posición 336, Phe en la posición 341, Ala en la posición 356, Gly en la posición 360, Glu en la posición 362, Arg en la posición 365, Glu en la posición 366, Lys en la posición 370, Val en la posición 371, Gly en la posición 372 o Val en la posición 373, estando dichas posiciones definidas con referencia a SEQ ID NO: 4.

Preferiblemente, un polipéptido de asparaginasa variante de la invención puede comprender todos de Ser en la posición 35, Leu en la posición 53, Ser en la posición 63, Ala en la posición 64, Asp en la posición 65, Asn en la posición 66, Ala en la posición 74, Ile en la posición 77, Ile en la posición 79, Gln en la posición 80, Thr en la posición 81, Glu en la posición 88, Pro en la posición 106, Val en la posición 108, Ser en la posición 111, Leu en la posición 114, Ala en la posición 117, Thr en la posición 119, Glu en la posición 122, Asp en la posición 126, Val en la posición 161, Ala en la posición 168, Gln en la posición 181, Pro en la posición 189, Ala en la posición 190, Leu en la posición 197, Val en la posición 205, Phe en la posición 208, Ser en la posición 211, Val en la posición 224, Asn en la posición 228, Ala en la posición 231, Ile en la posición 232, Val en la posición 233, Lys en la posición 236, Tyr en la posición 238, Thr en la posición 250, Thr en la posición 251, Val en la posición 254, Arg en la posición 255, Ser en la posición 259, Tyr en la posición 267, Gln en la posición 270, Asp en la posición 279, Asp en la posición 282, Asn en la posición 283, Lys en la posición 286, Ser en la posición 293, Ser en la posición 297, Ser en la posición 299, Ser en la posición 300, Gly en la posición 301, Ser en la posición 303, Asp en la posición 304, Ile en la posición 309, Ser en la posición 311, Thr en la posición 312, His en la posición 313, Ser en la posición 314, Ile en la posición 317, Thr en la posición 321, Gly en la posición 324, Pro en la posición 330, Glu en la posición 333, Gln en la posición 336, Phe en la posición 341, Ala en la posición 356, Gly en la posición 360, Glu en la posición 362, Arg en la posición 365, Glu en la posición 366, Lys en la posición 370, Val en la posición 371, Gly en la posición 372 y Val en la posición 373, estando dichas posiciones definidas con referencia a SEQ ID NO: 4.

Por lo tanto, se pueden identificar las posiciones en un polipéptido de asparaginasa variante de la descripción que corresponden a las posiciones 35, 53, 63, 64, 65, 66, 74, 77, 79, 80, 81, 88, 106, 108, 111, 114, 117, 119, 122, 126, 161, 168, 181, 189, 190, 197, 205, 208, 211, 224, 228, 231, 232, 233, 236, 238, 250, 251, 254, 255, 259, 267, 270, 279, 282, 283, 286, 293, 297, 299, 300, 301, 303, 304, 309, 311, 312, 313, 314, 317, 321, 324, 330, 333, 336, 341, 356, 360, 362, 365, 366, 370, 371, 372 y 373 pueden ser identificadas mediante el alineamiento de la secuencia del polipéptido variante con la de SEQ ID NO: 4 utilizando, por ejemplo, el alineamiento GAP a la secuencia más homóloga encontrada por el programa GAP (véase más abajo para más detalles de este programa). Las posiciones en la variante correspondientes a las posiciones 35, 53, 63, 64, 65, 66, 74, 77, 79, 80, 81, 88, 106, 108, 111, 114, 117, 119, 122, 126, 161, 168, 181, 189, 190, 197, 205, 208, 211, 224, 228, 231, 232, 233, 236, 238, 250, 251, 254, 255, 259, 267, 270, 279, 282, 283, 286, 293, 297, 299, 300, 301, 303, 304, 309, 311, 312, 313, 314, 317, 321, 324, 330, 333, 336, 341, 356, 360, 362, 365, 366, 370, 371, 372 y 373 en SEQ ID NO: 4 y se conocen como las posiciones definidas con referencia a SEQ ID NO: 4.

Además, un polipéptido de asparaginasa variante de la descripción no comprenderá, típicamente, uno o más, por ejemplo, dos, tres o todos los aminoácidos que corresponde a Asp 336, Thr 337, Ala 338 y Thr 339 en la secuencia de asparaginasa de tipo salvaje obtenida de *Aspergillus niger* según se describe en el documento WO 2004/030468. Es decir, cuando un polipéptido asparaginasa variante de la invención está alineado con la secuencia de asparaginasa de tipo salvaje obtenida de *Aspergillus niger* según se describe en el documento WO 2004/030468, no comprenderá, típicamente, uno o más de los aminoácidos correspondientes a los encontrados en las posiciones 336, 337, 338 y 339 de la secuencia de *A. niger* de tipo salvaje.

La invención proporciona una asparaginasa que tiene la anchura del perfil de actividad de pH que es al menos 4, preferiblemente al menos 5 unidades de pH de ancho. La asparaginasa de acuerdo con la invención que tiene la anchura del perfil de actividad de pH que es al menos 4, preferiblemente al menos 5 unidades de pH de ancho, es una asparaginasa que tiene una secuencia de aminoácidos establecida en una cualquiera de las SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4, y variantes adicionales de las mismas que tiene al menos un 90% de homología con al menos una de ellas.

Polinucleótidos

Como se expone anteriormente, la presente invención proporciona polinucleótidos que codifican una asparaginasa variante que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con una cualquiera de SEQ ID NO: 2 (denominada provisionalmente ASN001) o SEQ ID NO: 4 (denominada provisionalmente ASN002), y variantes adicionales de los mismos tal como equivalentes funcionales. Por lo tanto, la descripción proporciona un polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 y polinucleótidos variantes adicionales.

Con fines de claridad; SEQ ID NO: 1 es la secuencia de polinucleótido que codifica el polipéptido de acuerdo con SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3 es la secuencia de polinucleótido que codifica el polipéptido de acuerdo con SEQ ID NO: 4.

La descripción proporciona secuencias de polinucleótidos que comprenden el gen que codifica asparaginasa de acuerdo con la invención, así como su secuencia codificadora. Por consiguiente, la descripción se refiere a una secuencia de ácido nucleico que comprende:

- a) una secuencia de ADN que codifica la asparaginasa de acuerdo con una cualquiera de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4;
- b) una secuencia de ADN que codifica una asparaginasa que tiene al menos un 85% de homología con el polipéptido de acuerdo con una cualquiera de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4;
- c) una secuencia de ADN que tiene al menos un 80% de homología con una secuencia de ADN de acuerdo con a) o b);
- d) una secuencia de ADN que se hibrida con alta rigurosidad con una cadena complementaria de una secuencia de ADN de acuerdo con a) o b);
- e) una sub-secuencia de una secuencia de ADN según a), b), c) o d) que tiene al menos 100 nucleótidos; o
- f) una cadena complementaria de una secuencia de ADN según a), b), c), d) o e).

La descripción también se refiere a un polinucleótido asilado que codifica al menos un dominio funcional de un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4. A continuación esto se describe más en detalle para los polipéptidos de acuerdo con la descripción.

Típicamente, con respecto a SEQ ID NO: 2, un dominio de este tipo comprenderá un aminoácido o aminoácidos que corresponden a uno o más de Ala en la posición 25, Thr en la posición 28, Tyr en la posición 30, Ser en la posición 35, Leu en la posición 53, Ser en la posición 63, Ala en la posición 64, Asp en la posición 65, Asn en la posición 66, Ala en la posición 74, Ile en la posición 77, Ile en la posición 79, Gln en la posición 80, Thr en la posición 81, Glu en la posición 88, Pro en la posición 106, Val en la posición 108, Ser en la posición 111, Leu en la posición 114, Ala en la posición 117, Thr en la posición 119, Glu en la posición 122, Asp en la posición 126, Ser en la posición 131, Val en la posición 161, Ala en la posición 168, Gln en la posición 181, Pro en la posición 189, Ala en la posición 190, Leu en la posición 197, Val en la posición 205, Phe en la posición 208, Ala en la posición 210, Ser en la posición 211, Val en la posición 224, Asn en la posición 228, Ala en la posición 231, Ile en la posición 232, Val en la posición 233, Lys en la posición 236, Tyr en la posición 238, Tyr en la posición 240, Thr en la posición 250, Thr en la posición 251, Val en la posición 252, Val en la posición 254, Arg en la posición 255, Ser en la posición 259, Tyr en la posición 267, Gln en la posición 270, Gln en la posición 273, Ser en la posición 279, Asp en la posición 282, Asn en la posición 283, Lys en la posición 286, Ser en la posición 293, Ser en la posición 297, Ser en la posición 299, Gly en la posición 301, Ser en la posición 303, Asp en la posición 304, Asp en 307, Ile en la posición 309, Ala en la posición 310, Ser en la posición 311, Lys en la posición 312, His en la posición 313, Ser en la posición 314, Ile en la posición 317, Leu en la posición 319, Thr en la posición 321, Gly en la posición 324, Thr en la posición 330, Phe en la posición 345, Ala en la posición 351, Ala en la posición 360, Glu en la posición 361, Gly en la posición 364, Phe en la posición 365, Lys en la posición 366, Arg en la posición 369, Glu en la posición 370, Lys en la posición 374, Val en la posición 375 o Val en la posición 377, estando dichas posiciones definidas con referencia a SEQ ID NO: 2.

En una realización de la descripción, la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la descripción codifica un polipéptido, en donde el polipéptido es una variante que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene uno o más truncamientos y/o al menos una sustitución, delección y/o inserción de un aminoácido en comparación con la secuencia de aminoácidos 1 a 378 de SEQ ID NO: 2. Un polipéptido de este tipo comprenderá típicamente uno o más de Ala en la posición 25, Thr en la posición 28, Tyr en la posición 30, Ser en la posición 35, Leu en la posición 53, Ser en la posición 63, Ala en la posición 64, Asp en la posición 65, Asn en la posición 66, Ala en la posición 74, Ile en la posición 77, Ile en la posición 79, Gln en la posición 80, Thr en la posición 81, Glu en la posición 88, Pro en la posición 106, Val en la posición 108, Ser en la posición 111, Leu en la posición 114, Ala en la posición 117, Thr en la posición 119, Glu en la posición 122, Asp en la posición 126, Ser en la posición 131, Val en la posición 161, Ala en la posición 168, Gln en la posición 181, Pro en la posición 189, Ala en la posición 190, Leu en la posición 197, Val en la posición 205, Phe en la posición 208, Ala en la posición 210, Ser en la posición 211, Val en la posición 224, Asn en la posición 228, Ala en la posición 231, Ile en la posición 232, Val en la posición 233, Lys en la posición 236, Tyr en la posición 238, Tyr en la posición 240, Thr en la posición 250, Thr en la posición 251, Val en la posición 252,

Val en la posición 254, Arg en la posición 255, Ser en la posición 259, Tyr en la posición 267, Gln en la posición 270, Gln en la posición 273, Ser en la posición 279, Asp en la posición 282, Asn en la posición 283, Lys en la posición 286, Ser en la posición 293, Ser en la posición 297, Ser en la posición 299, Gly en la posición 301, Ser en la posición 303, Asp en la posición 304, Asp en 307, Ile en la posición 309, Ala en la posición 310, Ser en la posición 311, Lys en la posición 312, His en la posición 313, Ser en la posición 314, Ile en la posición 317, Leu en la posición 319, Thr en la posición 321, Gly en la posición 324, Thr en la posición 330, Phe en la posición 345, Ala en la posición 351, Ala en la posición 360, Glu en la posición 361, Gly en la posición 364, Phe en la posición 365, Lys en la posición 366, Arg en la posición 369, Glu en la posición 370, Lys en la posición 374, Val en la posición 375 o Val en la posición 377, estando dichas posiciones definidas con referencia a SEQ ID NO: 2.

10 Típicamente, con respecto a SEQ ID NO: 4, un dominio de este tipo comprenderá un aminoácido o aminoácidos que corresponden a uno o más de Ser en la posición 35, Leu en la posición 53, Ser en la posición 63, Ala en la posición 64, Asp en la posición 65, Asn en la posición 66, Ala en la posición 74, Ile en la posición 77, Ile en la posición 79, Gln en la posición 80, Thr en la posición 81, Glu en la posición 88, Pro en la posición 106, Val en la posición 108, Ser en la posición 111, Leu en la posición 114, Ala en la posición 117, Thr en la posición 119, Glu en la posición 122, Asp en la posición 126, Val en la posición 161, Ala en la posición 168, Gln en la posición 181, Pro en la posición 189, Ala en la posición 190, Leu en la posición 197, Val en la posición 205, Phe en la posición 208, Ser en la posición 211, Val en la posición 224, Asn en la posición 228, Ala en la posición 231, Ile en la posición 232, Val en la posición 233, Lys en la posición 236, Tyr en la posición 238, Thr en la posición 250, Thr en la posición 251, Val en la posición 254, Arg en la posición 255, Ser en la posición 259, Tyr en la posición 267, Gln en la posición 270, Asp en la posición 279, Asp en la posición 282, Asn en la posición 283, Lys en la posición 286, Ser en la posición 293, Ser en la posición 297, Ser en la posición 299, Ser en la posición 300, Gly en la posición 301, Ser en la posición 303, Asp en la posición 304, Ile en la posición 309, Ser en la posición 311, Thr en la posición 312, His en la posición 313, Ser en la posición 314, Ile en la posición 317, Thr en la posición 321, Gly en la posición 324, Pro en la posición 330, Glu en la posición 333, Gln en la posición 336, Phe en la posición 341, Ala en la posición 356, Gly en la posición 360, Glu en la posición 362, Arg en la posición 365, Glu en la posición 366, Lys en la posición 370, Val en la posición 371, Gly en la posición 372 y Val en la posición 373, estando dichas posiciones definidas con referencia a SEQ ID NO: 4.

En una realización de la invención, la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención codifica un polipéptido, en donde el polipéptido es una variante que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene uno o más truncamientos, y/o al menos una sustitución, delección y/o inserción de un aminoácido en comparación con la secuencia de aminoácidos 1 a 374 de la SEQ ID NO: 4. Un polipéptido de este tipo comprenderá típicamente uno o más de Ser en la posición 35, Leu en la posición 53, Ser en la posición 63, Ala en la posición 64, Asp en la posición 65, Asn en la posición 66, Ala en la posición 74, Ile en la posición 77, Ile en la posición 79, Gln en la posición 80, Thr en la posición 81, Glu en la posición 88, Pro en la posición 106, Val en la posición 108, Ser en la posición 111, Leu en la posición 114, Ala en la posición 117, Thr en la posición 119, Glu en la posición 122, Asp en la posición 126, Val en la posición 161, Ala en la posición 168, Gln en la posición 181, Pro en la posición 189, Ala en la posición 190, Leu en la posición 197, Val en la posición 205, Phe en la posición 208, Ser en la posición 211, Val en la posición 224, Asn en la posición 228, Ala en la posición 231, Ile en la posición 232, Val en la posición 233, Lys en la posición 236, Tyr en la posición 238, Thr en la posición 250, Thr en la posición 251, Val en la posición 254, Arg en la posición 255, Ser en la posición 259, Tyr en la posición 267, Gln en la posición 270, Asp en la posición 279, Asp en la posición 282, Asn en la posición 283, Lys en la posición 286, Ser en la posición 293, Ser en la posición 297, Ser en la posición 299, Ser en la posición 300, Gly en la posición 301, Ser en la posición 303, Asp en la posición 304, Ile en la posición 309, Ser en la posición 311, Thr en la posición 312, His en la posición 313, Ser en la posición 314, Ile en la posición 317, Thr en la posición 321, Gly en la posición 324, Pro en la posición 330, Glu en la posición 333, Gln en la posición 336, Phe en la posición 341, Ala en la posición 356, Gly en la posición 360, Glu en la posición 362, Arg en la posición 365, Glu en la posición 366, Lys en la posición 370, Val en la posición 371, Gly en la posición 372 y Val en la posición 373, estando dichas posiciones definidas con referencia a SEQ ID NO: 4.

La invención proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica una asparaginasa que tiene la anchura del perfil de actividad de pH que es al menos 4, preferiblemente al menos 5 unidades de pH ancho.

La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención es un ácido nucleico que comprende

- 50 a) una secuencia de ADN que codifica la asparaginasa de acuerdo con una cualquiera de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4;
- b) una secuencia de ADN que codifica una asparaginasa que tiene al menos un 90% de homología con el polipéptido de acuerdo con una cualquiera de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4, y en donde la asparaginasa codificada tiene una anchura del perfil de actividad del pH que es al menos 4 unidades de pH de ancho, en donde la anchura del perfil de actividad del pH es la anchura del intervalo de pHs calculada en unidades de pH en que la enzima exhibe 50 a 100% de su actividad máxima; o
- 55 c) una cadena complementaria de una secuencia de ADN de acuerdo con a) o b).

- 5 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "gen" y la expresión "gen recombinante" se refieren a moléculas de ácido nucleico que incluyen un marco de lectura abierto que codifica una asparaginasa variante tal como se describe en esta memoria, p. ej., una variante de asparaginasa de *Aspergillus niger* de tipo salvaje. Un gen puede incluir secuencias codificantes, secuencias no codificantes, intrones y secuencias reguladoras. Es decir, un "gen", tal como se utiliza en esta memoria, puede referirse a una molécula de ácido nucleico aislada tal como se define en esta memoria. Por consiguiente, el término "gen", en el contexto de la presente solicitud, no se refiere únicamente a secuencias que se producen de forma natural.
- 10 Una molécula de ácido nucleico de la presente invención se pueden generar utilizando técnicas estándares de biología molecular bien conocidas por los expertos en la técnica tomadas en combinación con la información de las secuencias proporcionada en esta memoria.
- Por ejemplo, utilizando técnicas sintéticas estándar, la molécula de ácido nucleico requerida puede ser sintetizada de novo. Un proceso sintético de este tipo será típicamente un proceso automatizado. Tales técnicas son bien conocidas por los expertos en la técnica.
- 15 Alternativamente, una molécula de ácido nucleico de la invención puede generarse mediante el 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 puede llevarse a cabo utilizando un cierto número de técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica.
- 20 En un método de este tipo, mencionado aquí simplemente a modo de ejemplo, la PCR se lleva a cabo en un molde de plásmido utilizando "cebadores" de oligonucleótidos que contienen la mutación deseada. Dado que los cebadores son los extremos de hebras recién sintetizadas, debería existir un desajuste durante el primer ciclo en la unión de la hebra de ADN del molde, después de esa primera ronda, la hebra basada en el cebador (que contiene la mutación) estaría en la misma concentración que el molde original. Después de ciclos sucesivos, crecería exponencialmente y después de 25, debería superar a la hebra no mutada original, en la región de 8 millones de: 1, resultando en una disolución casi homogénea de fragmentos amplificados mutados. El molde de ADN puede entonces ser eliminado por digestión enzimática, por ejemplo utilizando una enzima de restricción que escinde solamente ADN metilado tal como *Dpn1*. El molde, que se deriva de una preparación de plásmido de lisis alcalina y, por lo tanto, está metilado, se destruye en esta etapa, pero el plásmido mutado se conserva debido a que fue generado *in vitro* y, como resultado de ello, no está metilado.
- 25 En un método de este tipo se puede introducir más de una mutación en una molécula de ácido nucleico en una sola reacción de PCR, por ejemplo utilizando uno o más oligonucleótidos, cada uno de los cuales comprende uno o más apareamientos erróneos. Alternativamente, se puede introducir más de una mutación en una molécula de ácido nucleico llevando a cabo más de una reacción PCR, introduciendo cada una de las reacciones una o más mutaciones, de modo que los ácidos nucleicos alterados se introducen en el ácido nucleico de una manera secuencial, iterativa.
- 30 Un ácido nucleico de la invención se pueden generar utilizando ADNc, ARNm o, alternativamente, ADN genómico, como un molde y cebadores de oligonucleótidos erróneamente apareados apropiados de acuerdo con la técnica de mutagénesis dirigida al sitio descrito anteriormente. Una molécula de ácido nucleico derivada de esta manera puede clonarse en un vector apropiado y caracterizarse por análisis de secuencia de ADN.
- 35 Una secuencia de ácido nucleico de la descripción puede comprender una o más deleciones, es decir, huecos, en comparación con la secuencia de tipo salvaje de la secuencia de asparaginasa de tipo salvaje obtenida de *Aspergillus niger* según se describe en el documento WO 2004/030468 y/o con la secuencia expuesta en una cualquiera de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4. Tales deleciones/huecos también pueden generarse utilizando la mutagénesis dirigida al sitio utilizando oligonucleótidos apropiados. Técnicas para generar tales deleciones son bien conocidas para los expertos en la técnica.
- 40 Además de ello, los oligonucleótidos correspondientes a o hibridables con las secuencias de nucleótidos de acuerdo con la invención se pueden preparar mediante técnicas sintéticas estándares, p. ej., utilizando un sintetizador de ADN automatizado.
- 45 También, las moléculas de ácido nucleico complementarias se incluyen en la presente invención. Una molécula de ácido nucleico que es complementaria a otra secuencia de nucleótidos es una que es lo suficientemente complementaria a la otra secuencia de nucleótidos como para que pueda hibridarse con la otra secuencia de nucleótidos, formando con ello un dúplex estable.
- 50 Un aspecto de la descripción se refiere a moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican un polipéptido de la invención o un equivalente funcional del mismo tal como un fragmento biológicamente activo o de dominio, así como moléculas de ácido nucleico suficientes para su uso como sondas de hibridación para identificar moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido de la invención y fragmentos de tales moléculas de ácido nucleico adecuadas
- 55

para su uso como cebadores de PCR para la amplificación o mutación de moléculas de ácido nucleico tales como para la preparación de moléculas de ácido nucleico de la invención.

5 Un "polinucleótido aislado" o "ácido nucleico aislado" es un ADN o ARN que no está inmediatamente contiguo a las dos secuencias codificantes con las que está inmediatamente contiguo (una en el extremo 5' y una en el extremo 3') en el genoma que se produce de forma natural del organismo del que se deriva. Por lo tanto, en una realización, un ácido nucleico aislado incluye algunas o todas las secuencias 5' no codificantes (p. ej., promotor) que son 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 de replicación autónoma o en el ADN genómico de un procarionte o eucariote, o que existe como una molécula separada (p. ej., 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 químicos u otros productos químicos (cuando se sintetiza químicamente). Además de ello, un "fragmento de ácido nucleico aislado" es un fragmento de ácido nucleico que no es de origen natural como un fragmento y que no se encontraría en el estado natural.

20 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "polinucleótido" o la expresión "molécula de ácido nucleico" pretende incluir moléculas de ADN (p. ej., ADNc o ADN genómico) y moléculas de ARN (p. ej., ARNm) y análogos del ADN o ARN generados utilizando análogos de nucleótidos. La molécula de ácido nucleico puede ser de cadena sencilla o de cadena doble, pero preferiblemente es ADN de cadena doble. El ácido nucleico se puede sintetizar utilizando análogos o derivados de oligonucleótidos (p. ej., inosina o nucleótidos de fosforotioato). Tales oligonucleótidos se pueden utilizar, por ejemplo, para preparar ácidos nucleicos que han alterado la capacidad de apareamiento de bases o han aumentado la resistencia a las nucleasas.

25 Otra realización de la descripción proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que es antisentido a una molécula de ácido nucleico de la invención, p. ej., la cadena codificante de una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia expuesta en una cualquiera de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3. También se incluyen dentro del alcance de la descripción cadenas complementarias de las moléculas de ácido nucleico descritas en esta memoria.

Identidad y homología

30 El término "homología" o la expresión "porcentaje de identidad" se utilizan indistintamente en esta memoria. Para el propósito de esta invención, se define aquí que, a fin de determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o dos secuencias de ácidos nucleicos, las secuencias se alinean para propósitos de comparación óptima (p. ej., pueden introducirse huecos en la secuencia de un primer aminoácido o ácido nucleico para una alineación óptima con una segunda secuencia de aminoácidos o ácido nucleico). Se comparan luego los residuos de aminoácidos o nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo 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 solapantes) x 100). Preferiblemente, las dos secuencias tienen la misma longitud.

40 Puede llevarse a cabo una comparación de secuencias sobre la totalidad de las longitudes de las dos secuencias que se comparan o sobre fragmentos de las dos secuencias. Típicamente, la comparación se llevará a cabo sobre la longitud completa de las dos secuencias que se están comparando. Sin embargo, la identidad de secuencia puede llevarse a cabo sobre una zona de, por ejemplo, veinte, cincuenta, cien o más residuos de aminoácidos contiguos.

45 La persona experta será consciente del hecho de que están disponibles varios programas de ordenador diferentes para determinar la homología entre dos secuencias. Por ejemplo, una comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se pueden lograr utilizando un algoritmo matemático. En una realización preferida, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos se determina utilizando 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 Accelrys GCG (disponible en <http://www.accelrys.com/products/gcg/>), utilizando una matriz Blosom 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco 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 de identidad global de dos secuencias no se altera significativamente cuando se utilizan diferentes algoritmos.

55 El nucleótido o las secuencias de proteínas de la presente invención pueden utilizarse, además, como una "secuencia de consulta" para realizar una búsqueda en bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar otros miembros de la familia o secuencias relacionadas. Tales búsquedas se pueden realizar usando los programas BLASTN y BLASTP (versión 2.0) de Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10. Las búsquedas de proteínas BLAST pueden realizarse con el programa BLASTP, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener

secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteína de la invención. Para obtener alineamientos con huecos con fines comparativos, Gapped BLAST se puede utilizar 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 utilizar los parámetros por defecto de los programas respectivos (p. ej., BLASTP y BLASTN). Véase la página web del Center for Biotechnology Information en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Hibridación

Un polinucleótido de la invención y el complemento de la secuencia indicada en una cualquiera de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 típicamente pueden hibridarse a un nivel significativamente por encima del fondo. Se puede producir una hibridación de fondo, por ejemplo, debido a otros ADNc presentes en un banco de ADNc. El nivel de señal generado por la interacción entre un polinucleótido de la invención y el complemento de la secuencia codificante de una cualquiera de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 es típicamente al menos 10 veces, preferiblemente al menos 100 veces tan intensa como las interacciones entre otros polinucleótidos y la secuencia de una cualquiera de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3. La intensidad de la interacción puede medirse, por ejemplo, mediante radiomarcaje.

Tal como se utiliza en esta memoria, los términos "hibridar" y "hibridante" pretenden describir condiciones para la hibridación y el lavado bajo las cuales típicamente permanecen hibridadas entre sí secuencias de nucleótidos al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, preferiblemente al menos aproximadamente 80%, más preferiblemente al menos aproximadamente 85%, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 90% tal como al menos aproximadamente 95% homólogas entre sí, por ejemplo al menos aproximadamente el 98% homólogas entre sí, tal como al menos aproximadamente 99% homólogas entre sí, tal como se determina a lo largo de una región de al menos aproximadamente 20, por ejemplo al menos aproximadamente 50, tal como al menos aproximadamente 100, por ejemplo al menos aproximadamente 200, más preferiblemente al menos aproximadamente 300 nucleótidos contiguos o más preferiblemente a lo largo de la longitud completa de las secuencias a comparar.

Un ejemplo no limitante preferido de tales condiciones de hibridación son hibridación en 6X cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido de uno o más lavados en 1 X SSC, SDS al 0,1% a 50°C, preferiblemente a 55°C, preferiblemente a 60°C e incluso más preferiblemente a 65°C.

Condiciones altamente rigurosas incluyen, por ejemplo, hibridación a 68°C en disolución de 5x SSC/5x Denhardt/SDS al 1,0% y lavado en 0,2x SSC/SDS al 0,1% a temperatura ambiente. Alternativamente, el lavado se puede realizar a 42°C.

El experto en la materia sabrá qué condiciones aplicar para las condiciones de hibridación rigurosas y altamente rigurosas. Orientaciones adicionales con respecto a estas condiciones están fácilmente disponibles en la técnica, por ejemplo, en Sambrook et al, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, N.Y.; y Ausubel et al. (comps.), 1995, Current Protocols in Molecular Biology, (John Wiley & Sons, Nueva York).

Por supuesto, un polinucleótido que se hibrida solamente a una secuencia poli A (tal como el tramo poli (A) 3' terminal de los ARNm), o reside en un tramo complementario de T (o U), no estaría incluido en un polinucleótido de la invención utilizado para hibridarse específicamente a una porción de un ácido nucleico de la invención, ya que un polinucleótido de este tipo se hibridaría a cualquier molécula de ácido nucleico que contiene un tramo poli (A) o el complemento del mismo (p. ej., prácticamente cualquier clon de ADNc de doble cadena).

Cualquier combinación de los grados de identidad de secuencia y tamaños mínimos mencionados anteriormente puede utilizarse para definir polinucleótidos de la invención, prefiriéndose combinaciones más rigurosas (es decir, de una identidad de secuencia superior a lo largo de longitudes más largas).

Vectores

Otro aspecto de la invención pertenece a vectores, preferiblemente vectores de expresión, que contienen un ácido nucleico que codifica una variante de asparaginasa de la descripción, por ejemplo la proteína asparaginasa de una cualquiera de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4 o un equivalente funcional de cualquiera de ellas.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN de cadena doble circular, en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que los segmentos de ADN adicionales se pueden ligar en el genoma viral. Determinados vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (p. ej., vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episomales de mamíferos). Otros vectores (p. ej., no episomales de mamíferos) son vectores integrados en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped, y de ese modo se replican junto con el genoma del huésped. Además de ello, determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. A vectores de este tipo se les denomina en esta memoria "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" pueden utilizarse indistintamente en esta memoria, ya que el plásmido es la forma más comúnmente utilizada de vector. Sin embargo, la invención pretende incluir otras formas de vectores de expresión tales como vectores virales (p. ej., retrovirus defectuosos en la replicación, adenovirus y virus adeno-asociados) que sirven para 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 huésped, lo que significa que el vector de expresión recombinante incluye una o más secuencias reguladoras, seleccionadas sobre la base de las células huésped que se utilizarán para la expresión, que está unida operativamente a la secuencia de ácido nucleico a expresar. Dentro de un vector de expresión recombinante, "ligado operativamente" pretende significar que la secuencia de nucleótidos de interés está ligada a la o las secuencias reguladoras de una manera que permita la expresión de la secuencia de nucleótidos (p. ej., en un sistema de transcripción/traducción *in vitro* o en una célula huésped cuando el vector se introduce en la célula huésped). La expresión "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (p. ej., señal de poliadenilación). Secuencias reguladoras de este tipo se describen, por ejemplo, en Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Secuencias reguladoras incluyen las que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células huésped y las que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos sólo en una determinada célula huésped (p. ej., secuencias reguladoras específicas para tejidos). Se apreciará por los expertos en la técnica que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped a transformar, el nivel de expresión de proteína deseado, etc. Los vectores de expresión de la invención pueden introducirse en células huésped para producir con ello proteínas o péptidos, codificados por ácidos nucleicos según se describe en esta memoria (p. ej., la variante de asparaginasa de acuerdo con una cualquiera de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4 o una variante de cualquiera de ellas, por ejemplo, un equivalente o fragmento funcional, o una proteína de fusión que comprende uno o más de tales variantes).

Los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden diseñarse 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 insecto (utilizando vectores de expresión de baculovirus) células de levadura o células de mamífero. Células huésped adecuadas se discuten adicionalmente en Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Alternativamente, el vector de expresión recombinante puede transcribirse y traducirse *in vitro*, por ejemplo utilizando secuencias reguladoras del promotor T7 y polimerasa T7.

Vectores de expresión útiles en la presente invención incluyen vectores derivados de cromosomas, episomas y virus, p. ej., vectores derivados de plásmidos bacterianos, bacteriófagos, episoma de levadura, elementos cromosómicos de levadura, virus tales como baculovirus, papovavirus, virus vaccinia, adenovirus, virus de la viruela aviar, virus de pseudorrabia y retrovirus, y vectores derivados de combinaciones de los mismos, tales como los derivados de plásmido y elementos genéticos de bacteriófagos tales como cósmidos y fagémidos.

El inserto de ADN debe ser ligado operativamente a un promotor apropiado, tal como el promotor PL del fago lambda, los promotores lac, trp y tac de *E. coli*, los promotores SV40 temprano y tardío y los promotores de LTRs retrovirales, por nombrar unos pocos. Otros promotores adecuados serán conocidos por la persona experta. En una realización específica, se prefieren promotores que sean capaces de dirigir un nivel de expresión alto de asparaginasa en hongos filamentosos. Promotores de este tipo son conocidos en la técnica. Las construcciones de expresión pueden contener sitios para el inicio de la transcripción, terminación y, en la región transcrita, un sitio de unión al ribosoma para la traducción. La porción codificante de los transcritos maduros expresados por las construcciones incluirá un AUG de inicio de la traducción al principio y un codón de terminación apropiadamente posicionado al final del polipéptido a traducir.

ADN del vector puede introducirse en células procariontas o eucariotas a través de técnicas de transformación o transfección convencionales. Tal como se utiliza en esta memoria, los términos "transformación" y "transfección" pretenden referirse a una diversidad de técnicas reconocidas en la técnica para introducir ácido nucleico extraño (p. ej., ADN) en una célula huésped, incluyendo co-precipitación con fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transducción, infección, lipofección, transfección mediada por lípidos catiónica o electroporación. Métodos adecuados para transformar o transfectar células huésped pueden encontrarse en Sambrook, et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª, ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989), Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology* en *Molecular Biology* (1986) y otros manuales de laboratorio.

Para la transfección estable de células de mamífero se sabe que, dependiendo del vector de expresión y de la técnica de transfección utilizada, sólo una pequeña fracción de células puede integrar el ADN extraño en su genoma. Con el fin de identificar y seleccionar estos integrantes, un gen que codifica un marcador seleccionable (p. ej., resistencia a antibióticos) se introduce generalmente en las células hospedantes junto con el gen de interés.

Marcadores seleccionables preferidos incluyen los que confieren resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina y metatrexato. Ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable puede introducirse en una célula hospedante en el mismo vector que el que codifica una proteína variante de la invención, o se puede introducir en un vector separado. Células transfectadas de forma estable con el ácido nucleico introducido pueden identificarse mediante selección de fármacos (p. ej., células que han incorporado el gen marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células mueren).

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 de no fusión. Los vectores de fusión añaden un cierto número de aminoácidos a una proteína codificada en los mismos, p. ej. al extremo amino de la proteína recombinante. Vectores de fusión de este tipo sirven típicamente para tres propósitos: 1) para aumentar la expresión de la proteína recombinante; 2) para incrementar la solubilidad de la proteína recombinante; y 3) para ayudar en la purificación de la proteína recombinante actuando como ligando en la purificación por afinidad. A menudo, en los vectores de expresión de fusión, un sitio de escisión proteolítica se introduce en la unión del resto de fusión y la proteína recombinante para permitir la separación de la proteína recombinante del resto de fusión después de la purificación de la proteína de fusión.

Como se ha indicado, los vectores de expresión contendrán preferiblemente marcadores seleccionables. Tales marcadores incluyen dihidrofolato reductasa o resistencia a neomicina para el cultivo de células eucariotas y resistencia a tetraciclina o ampicilina para el cultivo en *E. coli* y otras bacterias. Ejemplos representativos de huéspedes apropiados incluyen células bacterianas tales como *E. coli*, *Streptomyces*, *Salmonella typhimurium* y determinadas especies de *Bacillus*; células fúngicas tales como especies de *Aspergillus*, por ejemplo *A. niger*, *A. oryzae* y *A. nidulans* tales como levaduras tales como *Kluyveromyces*, por ejemplo *K. lactis* y/o *Pichia*, por ejemplo *P. pastoris*; células de insecto tales como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9; células animales tales como CHO, COS y melanoma de Bowes; y células vegetales. Medios de cultivo y condiciones apropiados para las células huésped descritas anteriormente son conocidos en la técnica.

Vectores preferidos para uso en bacterias se describen por ejemplo en el documento WO-A1- 2004/074468. Otros vectores adecuados resultarán fácilmente evidentes para el experto en la materia.

Promotores bacterianos conocidos, adecuados para su uso en la presente invención, incluyen los promotores descritos en WO-A1-2004/074468.

La transcripción del ADN que codifica una variante de la presente invención por eucariotas superiores puede incrementarse insertando en el vector una secuencia potenciadora. Los potenciadores son elementos que actúan en cis de ADN, generalmente de aproximadamente 10 a 300 pb que actúan para aumentar la actividad transcripcional de un promotor en un tipo de célula huésped dado. Ejemplos de potenciadores incluyen el potenciador de SV40, que está situado en el lado tardío del origen de replicación en las pb 100 a 270, el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus.

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

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 adicionales, particularmente aminoácidos cargados, añadido al extremo N del polipéptido, por ejemplo, para mejorar la estabilidad y persistencia en la célula huésped, durante la purificación o durante la subsiguiente manipulación y almacenamiento. Además, restos peptídicos pueden añadirse a una variante de la invención para facilitar la purificación, por ejemplo mediante la adición de residuos histidina o una etiqueta T7.

Polipéptidos

La descripción proporciona una asparaginasa, que es:

- a) un polipéptido que tiene una secuencia amino tal como se muestra en una cualquiera de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4;
- b) un polipéptido que tiene al menos 85% de homología con un polipéptido de acuerdo con a);
- c) un polipéptido que se puede obtener de un polipéptido definido en a) o b) por sustitución, delección y/o inserción de uno o más aminoácidos;
- d) un polipéptido que es codificado por una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 que codifica el polipéptido maduro o una sub-secuencia de la misma que tiene al menos 100 nucleótidos.

ES 2 550 362 T3

Típicamente, con respecto a SEQ ID NO: 2, un polipéptido de acuerdo con b), c) o d) comprende uno o más de Ala en la posición 25, Thr en la posición 28, Tyr en la posición 30, Ser en la posición 35, Leu en la posición 53, Ser en la posición 63, Ala en la posición 64, Asp en la posición 65, Asn en la posición 66, Ala en la posición 74, Ile en la posición 77, Ile en la posición 79, Gln en la posición 80, Thr en la posición 81, Glu en la posición 88, Pro en la posición 106, Val en la posición 108, Ser en la posición 111, Leu en la posición 114, Ala en la posición 117, Thr en la posición 119, Glu en la posición 122, Asp en la posición 126, Ser en la posición 131, Val en la posición 161, Ala en la posición 168, Gln en la posición 181, Pro en la posición 189, Ala en la posición 190, Leu en la posición 197, Val en la posición 205, Phe en la posición 208, Ala en la posición 210, Ser en la posición 211, Val en la posición 224, Asn en la posición 228, Ala en la posición 231, Ile en la posición 232, Val en la posición 233, Lys en la posición 236, Tyr en la posición 238, Tyr en la posición 240, Thr en la posición 250, Thr en la posición 251, Val en la posición 252, Val en la posición 254, Arg en la posición 255, Ser en la posición 259, Tyr en la posición 267, Gln en la posición 270, Gln en la posición 273, Ser en la posición 279, Asp en la posición 282, Asn en la posición 283, Lys en la posición 286, Ser en la posición 293, Ser en la posición 297, Ser en la posición 299, Gly en la posición 301, Ser en la posición 303, Asp en la posición 304, Asp en 307, Ile en la posición 309, Ala en la posición 310, Ser en la posición 311, Lys en la posición 312, His en la posición 313, Ser en la posición 314, Ile en la posición 317, Leu en la posición 319, Thr en la posición 321, Gly en la posición 324, Thr en la posición 330, Phe en la posición 345, Ala en la posición 351, Ala en la posición 360, Glu en la posición 361, Gly en la posición 364, Phe en la posición 365, Lys en la posición 366, Arg en la posición 369, Glu en la posición 370, Lys en la posición 374, Val en la posición 375 o Val en la posición 377, estando dichas posiciones definidas con referencia a SEQ ID NO: 2.

Un polipéptido de la descripción puede comprender dos o más de Ala en la posición 25, Thr en la posición 28, Tyr en la posición 30, Ser en la posición 35, Leu en la posición 53, Ser en la posición 63, Ala en la posición 64, Asp en la posición 65, Asn en la posición 66, Ala en la posición 74, Ile en la posición 77, Ile en la posición 79, Gln en la posición 80, Thr en la posición 81, Glu en la posición 88, Pro en la posición 106, Val en la posición 108, Ser en la posición 111, Leu en la posición 114, Ala en la posición 117, Thr en la posición 119, Glu en la posición 122, Asp en la posición 126, Ser en la posición 131, Val en la posición 161, Ala en la posición 168, Gln en la posición 181, Pro en la posición 189, Ala en la posición 190, Leu en la posición 197, Val en la posición 205, Phe en la posición 208, Ala en la posición 210, Ser en la posición 211, Val en la posición 224, Asn en la posición 228, Ala en la posición 231, Ile en la posición 232, Val en la posición 233, Lys en la posición 236, Tyr en la posición 238, Tyr en la posición 240, Thr en la posición 250, Thr en la posición 251, Val en la posición 252, Val en la posición 254, Arg en la posición 255, Ser en la posición 259, Tyr en la posición 267, Gln en la posición 270, Gln en la posición 273, Ser en la posición 279, Asp en la posición 282, Asn en la posición 283, Lys en la posición 286, Ser en la posición 293, Ser en la posición 297, Ser en la posición 299, Gly en la posición 301, Ser en la posición 303, Asp en la posición 304, Asp en 307, Ile en la posición 309, Ala en la posición 310, Ser en la posición 311, Lys en la posición 312, His en la posición 313, Ser en la posición 314, Ile en la posición 317, Leu en la posición 319, Thr en la posición 321, Gly en la posición 324, Thr en la posición 330, Phe en la posición 345, Ala en la posición 351, Ala en la posición 360, Glu en la posición 361, Gly en la posición 364, Phe en la posición 365, Lys en la posición 366, Arg en la posición 369, Glu en la posición 370, Lys en la posición 374, Val en la posición 375 y Val en la posición 377, dichas posiciones se definen con referencia a SEQ ID NO: 2. Más preferiblemente, un polipéptido de la invención puede comprender todos los aminoácidos en las posiciones indicadas, dichas posiciones se definen con referencia a SEQ ID NO: 2.

Con respecto a SEQ ID NO: 4, un polipéptido de acuerdo con la invención puede comprender uno o más de Ser en la posición 35, Leu en la posición 53, Ser en la posición 63, Ala en la posición 64, Asp en la posición 65, Asn en la posición 66, Ala en la posición 74, Ile en la posición 77, Ile en la posición 79, Gln en la posición 80, Thr en la posición 81, Glu en la posición 88, Pro en la posición 106, Val en la posición 108, Ser en la posición 111, Leu en la posición 114, Ala en la posición 117, Thr en la posición 119, Glu en la posición 122, Asp en la posición 126, Val en la posición 161, Ala en la posición 168, Gln en la posición 181, Pro en la posición 189, Ala en la posición 190, Leu en la posición 197, Val en la posición 205, Phe en la posición 208, Ser en la posición 211, Val en la posición 224, Asn en la posición 228, Ala en la posición 231, Ile en la posición 232, Val en la posición 233, Lys en la posición 236, Tyr en la posición 238, Thr en la posición 250, Thr en la posición 251, Val en la posición 254, Arg en la posición 255, Ser en la posición 259, Tyr en la posición 267, Gln en la posición 270, Asp en la posición 279, Asp en la posición 282, Asn en la posición 283, Lys en la posición 286, Ser en la posición 293, Ser en la posición 297, Ser en la posición 299, Ser en la posición 300, Gly en la posición 301, Ser en la posición 303, Asp en la posición 304, Ile en la posición 309, Ser en la posición 311, Thr en la posición 312, His en la posición 313, Ser en la posición 314, Ile en la posición 317, Thr en la posición 321, Gly en la posición 324, Pro en la posición 330, Glu en la posición 333, Gln en la posición 336, Phe en la posición 341, Ala en la posición 356, Gly en la posición 360, Glu en la posición 362, Arg en la posición 365, Glu en la posición 366, Lys en la posición 370, Val en la posición 371, Gly en la posición 372 o Val en la posición 373, estando dichas posiciones definidas con referencia a SEQ ID NO: 4.

Un polipéptido de la descripción puede comprender dos o más de Ser en la posición 35, Leu en la posición 53, Ser en la posición 63, Ala en la posición 64, Asp en la posición 65, Asn en la posición 66, Ala en la posición 74, Ile en la posición 77, Ile en la posición 79, Gln en la posición 80, Thr en la posición 81, Glu en la posición 88, Pro en la posición 106, Val en la posición 108, Ser en la posición 111, Leu en la posición 114, Ala en la posición 117, Thr en la posición 119, Glu en la posición 122, Asp en la posición 126, Val en la posición 161, Ala en la posición 168, Gln en la

5 posición 181, Pro en la posición 189, Ala en la posición 190, Leu en la posición 197, Val en la posición 205, Phe en la posición 208, Ser en la posición 211, Val en la posición 224, Asn en la posición 228, Ala en la posición 231, Ile en la posición 232, Val en la posición 233, Lys en la posición 236, Tyr en la posición 238, Thr en la posición 250, Thr en la posición 251, Val en la posición 254, Arg en la posición 255, Ser en la posición 259, Tyr en la posición 267, Gln en la posición 270, Asp en la posición 279, Asp en la posición 282, Asn en la posición 283, Lys en la posición 286, Ser en la posición 293, Ser en la posición 297, Ser en la posición 299, Ser en la posición 300, Gly en la posición 301, Ser en la posición 303, Asp en la posición 304, Ile en la posición 309, Ser en la posición 311, Thr en la posición 312, His en la posición 313, Ser en la posición 314, Ile en la posición 317, Thr en la posición 321, Gly en la posición 324, Pro en la posición 330, Glu en la posición 333, Gln en la posición 336, Phe en la posición 341, Ala en la posición 356, Gly en la posición 360, Glu en la posición 362, Arg en la posición 365, Glu en la posición 366, Lys en la posición 370, Val en la posición 371, Gly en la posición 372 o Val en la posición 373, estando dichas posiciones definidas con referencia a SEQ ID NO: 4.

Más preferiblemente, un polipéptido de la invención puede comprender todos los aminoácidos en las posiciones indicadas, estando dichas posiciones definidas con referencia a SEQ ID NO: 4.

15 La invención proporciona una asparaginasa que tiene la anchura del perfil de actividad de pH que es al menos 4, preferiblemente al menos 5 unidades de pH de ancho. La asparaginasa de acuerdo con la invención es un asparaginasa, que es:

- a) un polipéptido que tiene una secuencia de amino tal como se muestra en una cualquiera de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4;
- 20 b) un polipéptido que tiene al menos un 90% de homología con un polipéptido de acuerdo con a) y en donde el polipéptido tiene una anchura del perfil de actividad del pH que es al menos 4 unidades de pH de ancho, en donde la anchura del perfil de actividad del pH es la anchura del intervalo de pHs calculada en unidades de pH en que la enzima exhibe 50 a 100% de su actividad máxima; o
- 25 c) un polipéptido que es codificado por una secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 que codifica el polipéptido maduro.

También, un péptido o polipéptido que comprende un equivalente funcional de los polipéptidos anteriores está comprendido dentro de la presente descripción. Los polipéptidos anteriores están comprendidos colectivamente en las expresiones "un polipéptido de acuerdo con la descripción" o "una variante de acuerdo con la descripción".

30 Los términos "péptido" y "oligopéptido" se consideran sinónimos (como se reconoce comúnmente) y cada uno de los términos puede utilizarse indistintamente, ya que el contexto requiere indicar una cadena de al menos dos aminoácidos acoplados por enlaces peptídicos. La palabra "polipéptido" se utiliza en esta memoria para cadenas que contienen más de siete restos aminoácidos. Todas las fórmulas o secuencias de oligopéptidos y polipéptidos de esta memoria se escriben de izquierda a derecha y en la dirección del extremo amino al extremo carboxi. El código de una letra de los aminoácidos utilizados en esta memoria se conoce comúnmente en la técnica 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, Nueva York, 1989).

40 Por polipéptido o proteína "aislado" se pretende dar a entender un polipéptido o proteína separado de su entorno nativo. Por ejemplo, los polipéptidos y proteínas producidos de forma recombinante expresados en células huésped se consideran aislados para el propósito de la invención como son polipéptidos nativos o recombinantes que han sido sustancialmente purificados 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).

Un polipéptido variante de acuerdo con la invención se puede recuperar y purificar a partir de cultivos de células recombinantes por métodos conocidos en la técnica. Lo más preferiblemente, para la purificación se emplea la cromatografía de intercambio iónico o cromatografía líquida de alta resolución ("HPLC").

45 Polipéptidos de la presente invención incluyen productos de procesos sintéticos químicos, y productos preparados por técnicas recombinantes a partir de un huésped procarionta o eucariota, incluyendo, por ejemplo, células bacterianas, de levadura, de plantas superiores, de insectos y de mamíferos. Dependiendo del huésped empleado en un proceso de producción recombinante, los polipéptidos de la presente invención pueden estar glicosilados o pueden no estar glicosilados. Además, los polipéptidos de la invención también pueden incluir un residuo metionina modificado inicial, en algunos casos como resultado de procesos mediados por el huésped.

Fragmentos de proteínas

La descripción también presenta fragmentos biológicamente activos de los polipéptidos de acuerdo con la descripción. Tales fragmentos se consideran abarcadas dentro de la expresión "una variante de la descripción".

55 Fragmentos biológicamente activos de un polipéptido de la descripción incluyen polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente idénticas a o derivadas de la secuencia de aminoácidos de una proteína variante de la descripción (p. ej., la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4), que incluyen

menos aminoácidos que la proteína de longitud completa, pero que exhiben al menos una actividad biológica de la proteína de longitud completa correspondiente. Típicamente, fragmentos biológicamente activos comprenden un dominio o motivo con al menos una actividad de una proteína variante de la invención. Preferiblemente, fragmentos biológicamente activos tendrán al menos la actividad de asparaginasa. Un fragmento biológicamente activo de una proteína de la invención puede ser un polipéptido que es, por ejemplo, de 10, 25, 50, 100 o más aminoácidos de longitud. Además de ello, otras porciones biológicamente activas, en las que se eliminan otras regiones de la proteína, se pueden preparar por técnicas recombinantes y evaluarse para una o más de las actividades biológicas de la forma nativa de un polipéptido de la invención.

Típicamente, con respecto a SEQ ID NO: 2, un fragmento de proteína de la invención comprenderá uno o más de Ala en la posición 25, Thr en la posición 28, Tyr en la posición 30, Ser en la posición 35, Leu en la posición 53, Ser en la posición 63, Ala en la posición 64, Asp en la posición 65, Asn en la posición 66, Ala en la posición 74, Ile en la posición 77, Ile en la posición 79, Gln en la posición 80, Thr en la posición 81, Glu en la posición 88, Pro en la posición 106, Val en la posición 108, Ser en la posición 111, Leu en la posición 114, Ala en la posición 117, Thr en la posición 119, Glu en la posición 122, Asp en la posición 126, Ser en la posición 131, Val en la posición 161, Ala en la posición 168, Gln en la posición 181, Pro en la posición 189, Ala en la posición 190, Leu en la posición 197, Val en la posición 205, Phe en la posición 208, Ala en la posición 210, Ser en la posición 211, Val en la posición 224, Asn en la posición 228, Ala en la posición 231, Ile en la posición 232, Val en la posición 233, Lys en la posición 236, Tyr en la posición 238, Tyr en la posición 240, Thr en la posición 250, Thr en la posición 251, Val en la posición 252, Val en la posición 254, Arg en la posición 255, Ser en la posición 259, Tyr en la posición 267, Gln en la posición 270, Gln en la posición 273, Ser en la posición 279, Asp en la posición 282, Asn en la posición 283, Lys en la posición 286, Ser en la posición 293, Ser en la posición 297, Ser en la posición 299, Gly en la posición 301, Ser en la posición 303, Asp en la posición 304, Asp en 307, Ile en la posición 309, Ala en la posición 310, Ser en la posición 311, Lys en la posición 312, His en la posición 313, Ser en la posición 314, Ile en la posición 317, Leu en la posición 319, Thr en la posición 321, Gly en la posición 324, Thr en la posición 330, Phe en la posición 345, Ala en la posición 351, Ala en la posición 360, Glu en la posición 361, Gly en la posición 364, Phe en la posición 365, Lys en la posición 366, Arg en la posición 369, Glu en la posición 370, Lys en la posición 374, Val en la posición 375 y Val en la posición 377, estando dichas posiciones definidas con referencia a SEQ ID NO: 2.

Un fragmento de proteína de la invención puede comprender dos o más de Ala en la posición 25, Thr en la posición 28, Tyr en la posición 30, Ser en la posición 35, Leu en la posición 53, Ser en la posición 63, Ala en la posición 64, Asp en la posición 65, Asn en la posición 66, Ala en la posición 74, Ile en la posición 77, Ile en la posición 79, Gln en la posición 80, Thr en la posición 81, Glu en la posición 88, Pro en la posición 106, Val en la posición 108, Ser en la posición 111, Leu en la posición 114, Ala en la posición 117, Thr en la posición 119, Glu en la posición 122, Asp en la posición 126, Ser en la posición 131, Val en la posición 161, Ala en la posición 168, Gln en la posición 181, Pro en la posición 189, Ala en la posición 190, Leu en la posición 197, Val en la posición 205, Phe en la posición 208, Ala en la posición 210, Ser en la posición 211, Val en la posición 224, Asn en la posición 228, Ala en la posición 231, Ile en la posición 232, Val en la posición 233, Lys en la posición 236, Tyr en la posición 238, Tyr en la posición 240, Thr en la posición 250, Thr en la posición 251, Val en la posición 252, Val en la posición 254, Arg en la posición 255, Ser en la posición 259, Tyr en la posición 267, Gln en la posición 270, Gln en la posición 273, Ser en la posición 279, Asp en la posición 282, Asn en la posición 283, Lys en la posición 286, Ser en la posición 293, Ser en la posición 297, Ser en la posición 299, Gly en la posición 301, Ser en la posición 303, Asp en la posición 304, Asp en 307, Ile en la posición 309, Ala en la posición 310, Ser en la posición 311, Lys en la posición 312, His en la posición 313, Ser en la posición 314, Ile en la posición 317, Leu en la posición 319, Thr en la posición 321, Gly en la posición 324, Thr en la posición 330, Phe en la posición 345, Ala en la posición 351, Ala en la posición 360, Glu en la posición 361, Gly en la posición 364, Phe en la posición 365, Lys en la posición 366, Arg en la posición 369, Glu en la posición 370, Lys en la posición 374, Val en la posición 375 y Val en la posición 377, estando dichas posiciones definidas con referencia a SEQ ID NO: 2. Más preferiblemente, un fragmento de proteína de la descripción puede comprender todos los aminoácidos en las posiciones indicadas, estando dichas posiciones definidas con referencia a SEQ ID NO: 2.

Típicamente, con respecto a SEQ ID NO: 4, un fragmento de proteína de la invención comprenderá uno o más de Ser en la posición 35, Leu en la posición 53, Ser en la posición 63, Ala en la posición 64, Asp en la posición 65, Asn en la posición 66, Ala en la posición 74, Ile en la posición 77, Ile en la posición 79, Gln en la posición 80, Thr en la posición 81, Glu en la posición 88, Pro en la posición 106, Val en la posición 108, Ser en la posición 111, Leu en la posición 114, Ala en la posición 117, Thr en la posición 119, Glu en la posición 122, Asp en la posición 126, Val en la posición 161, Ala en la posición 168, Gln en la posición 181, Pro en la posición 189, Ala en la posición 190, Leu en la posición 197, Val en la posición 205, Phe en la posición 208, Ser en la posición 211, Val en la posición 224, Asn en la posición 228, Ala en la posición 231, Ile en la posición 232, Val en la posición 233, Lys en la posición 236, Tyr en la posición 238, Thr en la posición 250, Thr en la posición 251, Val en la posición 254, Arg en la posición 255, Ser en la posición 259, Tyr en la posición 267, Gln en la posición 270, Asp en la posición 279, Asp en la posición 282, Asn en la posición 283, Lys en la posición 286, Ser en la posición 293, Ser en la posición 297, Ser en la posición 299, Ser en la posición 300, Gly en la posición 301, Ser en la posición 303, Asp en la posición 304, Ile en la posición 309, Ser en la posición 311, Thr en la posición 312, His en la posición 313, Ser en la posición 314, Ile en la posición 317,

Thr en la posición 321, Gly en la posición 324, Pro en la posición 330, Glu en la posición 333, Gln en la posición 336, Phe en la posición 341, Ala en la posición 356, Gly en la posición 360, Glu en la posición 362, Arg en la posición 365, Glu en la posición 366, Lys en la posición 370, Val en la posición 371, Gly en la posición 372 y Val en la posición 373, estando dichas posiciones definidas con referencia a SEQ ID NO: 4.

5 Un fragmento de proteína de la invención puede comprender dos o más de Ser en la posición 35, Leu en la posición 53, Ser en la posición 63, Ala en la posición 64, Asp en la posición 65, Asn en la posición 66, Ala en la posición 74, Ile en la posición 77, Ile en la posición 79, Gln en la posición 80, Thr en la posición 81, Glu en la posición 88, Pro en la posición 106, Val en la posición 108, Ser en la posición 111, Leu en la posición 114, Ala en la posición 117, Thr en la posición 119, Glu en la posición 122, Asp en la posición 126, Val en la posición 161, Ala en la posición 168, Gln en la posición 181, Pro en la posición 189, Ala en la posición 190, Leu en la posición 197, Val en la posición 205, Phe en la posición 208, Ser en la posición 211, Val en la posición 224, Asn en la posición 228, Ala en la posición 231, Ile en la posición 232, Val en la posición 233, Lys en la posición 236, Tyr en la posición 238, Thr en la posición 250, Thr en la posición 251, Val en la posición 254, Arg en la posición 255, Ser en la posición 259, Tyr en la posición 267, Gln en la posición 270, Asp en la posición 279, Asp en la posición 282, Asn en la posición 283, Lys en la posición 286, Ser en la posición 293, Ser en la posición 297, Ser en la posición 299, Ser en la posición 300, Gly en la posición 301, Ser en la posición 303, Asp en la posición 304, Ile en la posición 309, Ser en la posición 311, Thr en la posición 312, His en la posición 313, Ser en la posición 314, Ile en la posición 317, Thr en la posición 321, Gly en la posición 324, Pro en la posición 330, Glu en la posición 333, Gln en la posición 336, Phe en la posición 341, Ala en la posición 356, Gly en la posición 360, Glu en la posición 362, Arg en la posición 365, Glu en la posición 366, Lys en la posición 370, Val en la posición 371, Gly en la posición 372 y Val en la posición 373, dichas posiciones se definen con referencia a SEQ ID NO: 4. Más preferiblemente, un fragmento de proteína de la invención puede comprender todos los aminoácidos en las posiciones indicadas, estando dichas posiciones definidas con referencia a SEQ ID NO: 4.

La descripción también presenta fragmentos de ácido nucleico que codifican los fragmentos biológicamente activos anteriores (fragmentos biológicamente activos que son por sí mismos variantes de la descripción).

25 **Proteínas de fusión**

Las variantes de la descripción, tales como proteínas de la presente descripción o equivalentes funcionales de las mismas, p. ej., partes biológicamente activas y fragmentos de las mismas, pueden ser ligadas operativamente a un polipéptido no de acuerdo con la invención (por ejemplo, secuencias de aminoácidos heterólogas) para formar proteínas de fusión. Un polipéptido no de acuerdo con la invención en este contexto se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a una proteína que no es sustancialmente homóloga a una asparaginasa variante de la invención.

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, la expresión "ligada operativamente" pretende indicar que el polipéptido variante y el polipéptido no de acuerdo con la invención se condensan en marco uno al otro. El polipéptido no de acuerdo con la invención puede fusionarse al extremo N-terminal o C-terminal del polipéptido variante.

Por ejemplo, en una realización, la proteína de fusión es una proteína de fusión en la que la o las secuencias variantes está/están condensadas al extremo C de las secuencias de GST. Proteínas de fusión de este tipo 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 extremo N-terminal. En determinadas células huésped (p. ej., células huésped de mamíferos y de levadura), la expresión y/o secreción de una variante de la invención se puede aumentar a través del uso de una secuencia señal heteróloga.

En otro ejemplo, la secuencia secretora gp67 de la proteína de la envoltura de baculovirus se puede utilizar como una secuencia señal heteróloga (*Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., Comps., John Wiley & Sons, 1992). Otros ejemplos de secuencias señal heterólogas eucariotas incluyen las secuencias secretoras de melitina y de fosfatasa alcalina de placenta humana (Stratagene; La Jolla, California). En aún otro ejemplo, secuencias señal heterólogas procarióticas útiles incluyen la señal secretora phoA (Sambrook et al., *supra*) y la señal secretora de proteína A (Pharmacia Biotech; Piscataway, New Jersey).

Se puede utilizar 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 generalmente se escinde de la proteína madura durante la secreción en uno o más eventos de escisión. Péptidos señal de este tipo contienen sitios de procesamiento que permiten la escisión de la secuencia señal de las proteínas maduras a medida que pasan a través de la vía secretora. La secuencia señal puede dirigir la secreción de la variante tal como de un huésped eucariota en el que se transforma el vector de expresión, y la secuencia señal puede ser entonces escindida posterior o simultáneamente. La variante de la invención se puede purificar entonces fácilmente del medio extracelular por métodos conocidos. Alternativamente, la secuencia señal puede ser enlazada a la variante de

- interés utilizando una secuencia que facilita la purificación tal como con un dominio GST. Así, por ejemplo, la secuencia que codifica la variante de la descripción puede fusionarse a una secuencia marcadora tal como una secuencia que codifica un péptido que facilita la purificación de la variante condensada de la descripción. En determinadas realizaciones preferidas, 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 disponibles comercialmente. Tal como se describe en *Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824 (1989)*, por ejemplo, la hexa-histidina proporciona una 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 influenza, que ha sido descrito por *Wilson et al., Cell 37:767 (1984)*, por ejemplo.
- Una proteína de fusión se puede producir por técnicas estándares de ADN recombinante. Por ejemplo, fragmentos de ADN que codifican las diferentes secuencias de polipéptidos se ligan juntas en marco de acuerdo con técnicas convencionales, por ejemplo mediante el empleo de finales de extremos romos o extremos escalonados para la ligación, digestión con enzimas de restricción para proporcionar finales apropiados, el relleno de extremos cohesivos según sea apropiado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar una unión indeseable y ligación enzimática. En otra realización, el gen de fusión puede sintetizarse por técnicas convencionales incluyendo sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, la amplificación por PCR de fragmentos de genes puede llevarse a cabo utilizando cebadores de anclaje que dan lugar a salientes complementarios entre dos fragmentos de genes consecutivos, que posteriormente pueden re-asociarse y re-amplificarse para generar una secuencia de genes quimérica (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, comps. Ausubel et al. John Wiley & Sons: 1992). Además de ello, muchos vectores de expresión están comercialmente disponibles que ya codifican un resto de fusión (p. ej., un polipéptido GST). Un ácido nucleico que codifica la variante puede clonarse en un vector de expresión de este tipo tal de manera que el resto de fusión está enlazado en marco a dicha variante.

Equivalentes funcionales

- Las expresiones "equivalentes funcionales" y "variantes funcionales" se utilizan indistintamente en esta memoria. Equivalentes funcionales de acuerdo con la descripción son fragmentos de ADN aislados que codifican un polipéptido que exhibe una función particular de las variantes de asparaginasa de *Aspergillus niger* según se define en esta memoria. Un equivalente funcional de un polipéptido de acuerdo con la descripción es un polipéptido que exhibe al menos una función de una variante de asparaginasa de *Aspergillus niger* según se define en esta memoria. Equivalentes funcionales, por lo tanto, también abarcan fragmentos biológicamente activos y quedan abarcados por sí mismos dentro de la expresión "una variante" de la descripción.

- Preferiblemente, un polipéptido equivalente funcional respecto a SEQ ID NO: 2 de la invención comprende uno o más de Ala en la posición 25, Thr en la posición 28, Tyr en la posición 30, Ser en la posición 35, Leu en la posición 53, Ser en la posición 63, Ala en la posición 64, Asp en la posición 65, Asn en la posición 66, Ala en la posición 74, Ile en la posición 77, Ile en la posición 79, Gln en la posición 80, Thr en la posición 81, Glu en la posición 88, Pro en la posición 106, Val en la posición 108, Ser en la posición 111, Leu en la posición 114, Ala en la posición 117, Thr en la posición 119, Glu en la posición 122, Asp en la posición 126, Ser en la posición 131, Val en la posición 161, Ala en la posición 168, Gln en la posición 181, Pro en la posición 189, Ala en la posición 190, Leu en la posición 197, Val en la posición 205, Phe en la posición 208, Ala en la posición 210, Ser en la posición 211, Val en la posición 224, Asn en la posición 228, Ala en la posición 231, Ile en la posición 232, Val en la posición 233, Lys en la posición 236, Tyr en la posición 238, Tyr en la posición 240, Thr en la posición 250, Thr en la posición 251, Val en la posición 252, Val en la posición 254, Arg en la posición 255, Ser en la posición 259, Tyr en la posición 267, Gln en la posición 270, Gln en la posición 273, Ser en la posición 279, Asp en la posición 282, Asn en la posición 283, Lys en la posición 286, Ser en la posición 293, Ser en la posición 297, Ser en la posición 299, Gly en la posición 301, Ser en la posición 303, Asp en la posición 304, Asp en 307, Ile en la posición 309, Ala en la posición 310, Ser en la posición 311, Lys en la posición 312, His en la posición 313, Ser en la posición 314, Ile en la posición 317, Leu en la posición 319, Thr en la posición 321, Gly en la posición 324, Thr en la posición 330, Phe en la posición 345, Ala en la posición 351, Ala en la posición 360, Glu en la posición 361, Gly en la posición 364, Phe en la posición 365, Lys en la posición 366, Arg en la posición 369, Glu en la posición 370, Lys en la posición 374, Val en la posición 375 o Val en la posición 377, estando dichas posiciones definidas con referencia a SEQ ID NO: 2.

- Por consiguiente, un polipéptido de asparaginasa variante de la descripción puede comprender dos, tres, cuatro, cinco, por ejemplo al menos 10, al menos 15, al menos 20 tal como al menos 25, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80 o la totalidad de Ala en la posición 25, Thr en la posición 28, Tyr en la posición 30, Ser en la posición 35, Leu en la posición 53, Ser en la posición 63, Ala en la posición 64, Asp en la posición 65, Asn en la posición 66, Ala en la posición 74, Ile en la posición 77, Ile en la posición 79, Gln en la posición 80, Thr en la posición 81, Glu en la posición 88, Pro en la posición 106, Val en la posición 108, Ser en la posición 111, Leu en la posición 114, Ala en la posición 117, Thr en la posición 119, Glu en la posición 122, Asp en la posición 126, Ser en la posición 131, Val en la posición 161, Ala en la posición 168, Gln en la posición 181, Pro en la posición 189, Ala en la posición 190, Leu en la posición 197, Val en la posición 205, Phe en la posición 208, Ala en la posición 210, Ser en la posición 211, Val en la posición 224, Asn en la posición 228, Ala en la posición 231, Ile

5 en la posición 232, Val en la posición 233, Lys en la posición 236, Tyr en la posición 238, Tyr en la posición 240, Thr en la posición 250, Thr en la posición 251, Val en la posición 252, Val en la posición 254, Arg en la posición 255, Ser en la posición 259, Tyr en la posición 267, Gln en la posición 270, Gln en la posición 273, Ser en la posición 279, Asp en la posición 282, Asn en la posición 283, Lys en la posición 286, Ser en la posición 293, Ser en la posición 297, Ser en la posición 299, Gly en la posición 301, Ser en la posición 303, Asp en la posición 304, Asp en 307, Ile en la posición 309, Ala en la posición 310, Ser en la posición 311, Lys en la posición 312, His en la posición 313, Ser en la posición 314, Ile en la posición 317, Leu en la posición 319, Thr en la posición 321, Gly en la posición 324, Thr en la posición 330, Phe en la posición 345, Ala en la posición 351, Ala en la posición 360, Glu en la posición 361, Gly en la posición 364, Phe en la posición 365, Lys en la posición 366, Arg en la posición 369, Glu en la posición 370, Lys en la posición 374, Val en la posición 375 o Val en la posición 377, estando dichas posiciones definidas con referencia a la SEQ ID NO: 2.

15 Preferiblemente, un polipéptido equivalente funcional respecto a SEQ ID NO: 4 de la invención comprende uno o más de Ser en la posición 35, Leu en la posición 53, Ser en la posición 63, Ala en la posición 64, Asp en la posición 65, Asn en la posición 66, Ala en la posición 74, Ile en la posición 77, Ile en la posición 79, Gln en la posición 80, Thr en la posición 81, Glu en la posición 88, Pro en la posición 106, Val en la posición 108, Ser en la posición 111, Leu en la posición 114, Ala en la posición 117, Thr en la posición 119, Glu en la posición 122, Asp en la posición 126, Val en la posición 161, Ala en la posición 168, Gln en la posición 181, Pro en la posición 189, Ala en la posición 190, Leu en la posición 197, Val en la posición 205, Phe en la posición 208, Ser en la posición 211, Val en la posición 224, Asn en la posición 228, Ala en la posición 231, Ile en la posición 232, Val en la posición 233, Lys en la posición 236, Tyr en la posición 238, Thr en la posición 250, Thr en la posición 251, Val en la posición 254, Arg en la posición 255, Ser en la posición 259, Tyr en la posición 267, Gln en la posición 270, Asp en la posición 279, Asp en la posición 282, Asn en la posición 283, Lys en la posición 286, Ser en la posición 293, Ser en la posición 297, Ser en la posición 299, Ser en la posición 300, Gly en la posición 301, Ser en la posición 303, Asp en la posición 304, Ile en la posición 309, Ser en la posición 311, Thr en la posición 312, His en la posición 313, Ser en la posición 314, Ile en la posición 317, Thr en la posición 321, Gly en la posición 324, Pro en la posición 330, Glu en la posición 333, Gln en la posición 336, Phe en la posición 341, Ala en la posición 356, Gly en la posición 360, Glu en la posición 362, Arg en la posición 365, Glu en la posición 366, Lys en la posición 370, Val en la posición 371, Gly en la posición 372 y Val en la posición 373, estando dichas posiciones definidas con referencia a SEQ ID NO: 4.

30 Por consiguiente, un polipéptido variante de asparaginasa de la invención puede comprender dos, tres, cuatro, cinco, por ejemplo al menos 10, al menos 15, al menos 20 tal como al menos 25, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70 o la totalidad de Ser en la posición 35, Leu en la posición 53, Ser en la posición 63, Ala en la posición 64, Asp en la posición 65, Asn en la posición 66, Ala en la posición 74, Ile en la posición 77, Ile en la posición 79, Gln en la posición 80, Thr en la posición 81, Glu en la posición 88, Pro en la posición 106, Val en la posición 108, Ser en la posición 111, Leu en la posición 114, Ala en la posición 117, Thr en la posición 119, Glu en la posición 122, Asp en la posición 126, Val en la posición 161, Ala en la posición 168, Gln en la posición 181, Pro en la posición 189, Ala en la posición 190, Leu en la posición 197, Val en la posición 205, Phe en la posición 208, Ser en la posición 211, Val en la posición 224, Asn en la posición 228, Ala en la posición 231, Ile en la posición 232, Val en la posición 233, Lys en la posición 236, Tyr en la posición 238, Thr en la posición 250, Thr en la posición 251, Val en la posición 254, Arg en la posición 255, Asp en la posición 279, Asp en la posición 282, Asn en la posición 283, Lys en la posición 286, Ser en la posición 293, Ser en la posición 297, Ser en la posición 299, Ser en la posición 300, Gly en la posición 301, Ser en la posición 303, Asp en la posición 304, Ile en la posición 309, Ser en la posición 311, Thr en la posición 312, His en la posición 313, Ser en la posición 314, Ile en la posición 317, Thr en la posición 321, Gly en la posición 324, Pro en la posición 330, Glu en la posición 333, Gln en la posición 336, Phe en la posición 341, Ala en la posición 356, Gly en la posición 360, Glu en la posición 362, Arg en la posición 365, Glu en la posición 366, Lys en la posición 370, Val en la posición 371, Gly en la posición 372 y Val en la posición 373, estando dichas posiciones definidas con referencia a SEQ ID NO: 4.

50 Equivalentes funcionales de proteínas o polipéptidos pueden contener sustituciones de uno o más aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4 o sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos no esenciales. Por consiguiente, un aminoácido no esencial es un residuo que puede ser alterado en una cualquiera de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4, sin alterar sustancialmente la función biológica. Además, aminoácidos conservados entre las proteínas de acuerdo con la presente invención y otros asparaginasas no es probable que sean susceptibles a alteraciones.

55 Las sustituciones de aminoácidos se pueden hacer con una cualquiera de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4, por ejemplo de 1, 2 ó 3 a aproximadamente 10, aproximadamente 20, aproximadamente 30 o más sustituciones, para proporcionar una variante funcional de la invención.

Equivalentes funcionales de ácidos nucleicos pueden contener típicamente mutaciones silenciosas o mutaciones que no alteran la función biológica del polipéptido codificado. Por consiguiente, la descripción proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína asparaginasa variante que contiene cambios en los residuos de

- aminoácidos que no son esenciales para una actividad biológica particular. Proteínas variantes de este tipo difieren en la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4, sin embargo conservan al menos una actividad biológica de la misma. En una realización, la molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína, en donde la proteína comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga de al menos aproximadamente 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más homóloga a la secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de las SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4.
- Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una variante de la invención que es homóloga, típicamente sustancialmente homóloga, a la proteína de acuerdo con una cualquiera de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4 se puede crear introduciendo una o más sustituciones de nucleótidos, adiciones o deleciones en las secuencias de nucleótidos codificantes de acuerdo con la descripción de tal manera que en la proteína codificada se introducen uno o más aminoácidos sustituciones, deleciones o inserciones. Mutaciones de este tipo pueden introducirse por técnicas estándares tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR.
- Tal como se define en esta memoria, la expresión "sustancialmente homóloga" se refiere a una primera secuencia de aminoácidos o nucleótidos que contiene un número suficiente o mínimo de aminoácidos o nucleótidos idénticos o equivalentes (p. ej., con una cadena lateral similar) a una segunda secuencia de aminoácidos o de nucleótidos, de tal manera que la primera y la segunda secuencias de aminoácidos o nucleótidos tienen un dominio común. Por ejemplo, secuencias de aminoácidos o nucleótidos que contienen un dominio común que tiene aproximadamente 60%, preferiblemente 65%, más preferiblemente 70%, incluso más preferiblemente 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad o más se definen en esta memoria como suficientemente idénticas.
- Moléculas de ácido nucleico correspondiente a, es decir, que codifican asparaginasas variantes de la invención pueden aislarse basándose en su homología con los ácidos nucleicos de la invención descrita en esta memoria utilizando los ADNcs descritos en esta memoria.
- La persona experta reconocerá que pueden introducirse cambios por mutación en las secuencias de nucleótidos de acuerdo con la descripción, conduciendo con ello a cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína resultante sin alterar sustancialmente la función de dicha proteína.
- En otro aspecto de la invención, se proporcionan proteínas variantes de asparaginasa mejoradas. Proteínas variantes de asparaginasa mejoradas son proteínas en donde está mejorada al menos una actividad biológica, por ejemplo en comparación con una asparaginasa de tipo salvaje tal como de *A. niger*.
- En particular, las proteínas variantes de la descripción pueden tener una actividad específica mejorada a un pH dado en comparación con una asparaginasa de tipo salvaje tal como *A. niger* según se describe en SEQ ID NO: 3 del documento WO 2004/030468 o pueden tener una respuesta de pH mejorada, por ejemplo pueden ser más alcalifílicas o acidófilas, en comparación con una asparaginasa de tipo salvaje tal como de *A. niger* según se describe en SEQ ID NO: 3 del documento WO 2004/030468. Por ejemplo proteínas variantes de la descripción pueden tener una actividad específica a pH de al menos 5 que es mayor en comparación con la actividad específica de la asparaginasa de tipo salvaje de *A. niger* según se describe en SEQ ID NO: 3 del documento WO 2004/030468, medida en las mismas condiciones. Por ejemplo, la asparaginasa de tipo salvaje de *A. niger* según se describe en SEQ ID NO: 3 del documento WO 2004/030468 tiene un óptimo de pH de pH 4 a pH 5. Una proteína variante de la descripción puede ser más alcalifílica que una enzima de tipo salvaje, es decir, puede tener, por ejemplo, un óptimo de pH de pH 6 a pH 7. Una variante puede, sin embargo, ser más acidófila que una asparaginasa de tipo salvaje.
- Diversas proteínas de la invención pueden tener la anchura del perfil de actividad de pH que es al menos 4, preferiblemente al menos 5 unidades de pH de ancho.
- Proteínas de este tipo se pueden obtener mediante la introducción de mutaciones al azar a lo largo de la totalidad o parte de una secuencia codificante de la invención tal como mediante mutagénesis de saturación. Los mutantes resultantes pueden entonces ser expresados de forma recombinante y rastreadse en cuanto a la actividad biológica. Por ejemplo, la técnica proporciona ensayos estándares para medir la actividad enzimática de asparaginasa y se pueden seleccionar fácilmente proteínas así mejoradas.
- En una realización preferida, la variante de asparaginasa de la invención tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con una cualquiera de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4.
- En otra realización, una variante de la invención es sustancialmente homóloga a la secuencia de aminoácidos de acuerdo con una cualquiera de las SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4 y típicamente también conserva al menos una actividad biológica del polipéptido de acuerdo con una cualquiera de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4, sin embargo, pueden diferir en la secuencia de aminoácidos debido a mutagénesis según se describió anteriormente.
- En una realización preferida adicional, una variante de asparaginasa de la invención tiene una secuencia de aminoácidos codificada por un fragmento de ácido nucleico aislado capaz de hibridarse a un ácido nucleico de acuerdo con la invención, preferiblemente en condiciones de hibridación altamente rigurosas.

Por consiguiente, una variante de asparaginasa de la descripción es preferiblemente una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más homóloga a la secuencia de aminoácidos mostrada en una cualquiera de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4 y conserva al menos una actividad funcional del polipéptido de acuerdo con una cualquiera de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4.

5 Variantes de la descripción, por ejemplo equivalentes funcionales de una proteína de acuerdo con la descripción, también se pueden identificar, p. ej., mediante el rastreo de bancos combinatorios de mutantes, p. ej., mutantes de truncamiento, de la proteína de la invención para la actividad de asparaginasa. En una realización, un banco diversificado de variantes se genera por mutagénesis combinatoria a nivel del ácido nucleico. Un banco variado de
10 variantes puede producirse, por ejemplo, ligando enzimáticamente una mezcla de oligonucleótidos sintéticos en secuencias de genes de tal manera que un conjunto degenerado de secuencias de proteínas potenciales es expresable como polipéptidos individuales o, alternativamente, como un conjunto de proteínas de fusión mayores (p. ej., para la presentación en fagos). Existe una diversidad de métodos que pueden ser utilizados para producir bancos de variantes potenciales de los polipéptidos de la descripción a partir de una secuencia de oligonucleótidos degenerada. Métodos para sintetizar oligonucleótidos degenerados se conocen en la técnica (véase, p. ej., Narang
15 (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, bancos de fragmentos de la secuencia que codifica un polipéptido de la invención se pueden utilizar para generar una población variada de polipéptidos para el rastreo de una selección subsiguiente de variantes. Por ejemplo, un banco de fragmentos de secuencia codificantes puede generarse tratando un fragmento de PCR de
20 cadena doble de la secuencia codificante de interés con una nucleasa en condiciones en las que la incisión se produce sólo aproximadamente una vez por molécula, desnaturalizando el ADN de cadena doble, renaturalizando el ADN para formar ADN de cadena doble que puede incluir pares sentido/antisentido de diferentes productos con incisión, separando porciones de cadena sencilla de los dúplex reformados mediante tratamiento con nucleasa S1, y ligando el banco de fragmentos resultante en un vector de expresión. Mediante este método, se puede derivar un
25 banco de expresión que codifica fragmentos N-terminales e internos de diversos tamaños de la proteína de interés.

Varias técnicas son conocidas en la técnica para el rastreo de productos génicos de bancos combinatorios hechos por mutaciones puntuales de truncamiento, y para el rastreo de bancos de ADNc para productos génicos que tengan una propiedad seleccionada. Las técnicas más utilizadas, que son susceptibles de análisis de alto rendimiento, para rastrear grandes bancos de genes incluyen típicamente la clonación del banco de genes en vectores de expresión
30 replicables, la transformación de células apropiadas con el banco resultante de vectores, y la expresión de los genes combinatorios en condiciones en las que la detección de una actividad deseada facilita el aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto se detectó. Puede utilizarse la mutagénesis de ensamblaje recursivo (REM), una técnica que mejora la frecuencia de mutantes funcionales en los bancos, en combinación con los ensayos de rastreo para identificar variantes de una proteína de la invención (Arkin y Yourvan (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7811- 7815; Delgrave et al. (1993) *Protein Engineering* 6 (3): 327-331).

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

Ácidos nucleicos de acuerdo con la invención, independientemente de si codifican polipéptidos funcionales o no
40 funcionales, pueden utilizarse como sondas de hibridación o cebadores de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Usos de las moléculas de ácido nucleico de la presente invención que no codifican un polipéptido que tiene actividad de asparaginasa incluyen, entre otros, (1) la hibridación *in situ* (p. ej., FISH) a dispersiones cromosómicas en metafase para proporcionar la localización cromosómica precisa de un gen que codifica asparaginasa tal como se describe en Verma *et al.*, *Human Chromosomes: a manual of basic Techniques*, Pergamon Press, Nueva York
45 (1988); (2) análisis de transferencia Northern para detectar la expresión de ARNm de asparaginasa en los tejidos y/o células específicos; y (3) sondas y cebadores que pueden ser utilizados como una herramienta de diagnóstico para analizar la presencia de un ácido nucleico hibridable a una sonda o cebador en una muestra biológica (p. ej., tejido) dada.

También queda abarcado por la descripción un método de obtención de un equivalente funcional de un polinucleótido de la invención. Dicho método implica la obtención de una sonda marcada que incluye un ácido nucleico aislado que codifica la totalidad o una porción de la secuencia de la proteína de acuerdo con una cualquiera de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4 o una variante de la misma; el rastreo de un banco de fragmentos de ácido nucleico con la sonda marcada en condiciones que permiten la hibridación de la sonda a fragmentos de ácido nucleico en el banco, formando de este modo dúplex de ácidos nucleicos, y la preparación de una secuencia de gen
50 de longitud completa a partir de los fragmentos de ácido nucleico en cualquier dúplex marcado para obtener una secuencia relacionada con un polinucleótido de la invención.

Células huésped

En otra realización, la invención presenta células, p. ej., células huésped transformadas o células huésped recombinantes que contienen un ácido nucleico abarcado por la invención. Una "célula transformada" o "célula recombinante" es una célula en la que (o en un antepasado de la cual) se ha introducido, por medio de técnicas de ADN recombinante, un ácido nucleico de acuerdo con la invención. Se incluyen tanto células procariontas como eucariotas, p. ej., bacterias, hongos, levaduras, y similares, especialmente preferidas son células de hongos filamentosos, en particular *Aspergillus niger*.

Se puede elegir una célula huésped que module la expresión de las secuencias insertadas, o modifica y procesa el producto codificado por la secuencia de ácido nucleico incorporada en un modo específico deseado. Tales modificaciones (p. ej., glicosilación) y el procesamiento (p. ej., escisión) de productos proteicos puede facilitar el funcionamiento óptimo de la proteína codificada.

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

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

Si se desea, una línea de células transfectadas establemente puede producir una variante de acuerdo con la invención. Está disponible al público un cierto número de vectores adecuados para la transfección estable de células de mamífero, métodos para construir tales líneas celulares también son conocidos públicamente, p. ej., en Ausubel et al. (*supra*).

Uso de una variante de la asparaginasa de la invención en procesos industriales

La presente invención describe, además, una composición que comprende las asparaginastas de acuerdo con la invención. La composición puede comprender, opcionalmente, otros ingredientes, p. ej., otras enzimas. Las variantes de asparaginasa de acuerdo con la invención o composiciones que comprenden dichos asparaginastas se pueden utilizar en la producción de un producto alimenticio. En una realización de la invención, las variantes de asparaginasa de acuerdo con la invención o composiciones que comprenden dichos asparaginastas se puede utilizar para reducir la cantidad de acrilamida formada en un producto alimenticio procesado térmicamente basado en una asparagina que contiene materia prima. Estas variantes se pueden utilizar, por ejemplo, en un proceso para la producción de un producto alimenticio que implica al menos una etapa de calentamiento, que comprende la adición de una o más enzimas asparaginasa a una forma intermedia de dicho producto alimenticio en dicho proceso de producción mediante el cual se añade la enzima antes de dicha etapa de calentamiento en una cantidad que es eficaz para reducir el nivel de asparaginasa que está presente en dicha forma intermedia de dicho producto alimenticio. Un procedimiento de este tipo se describe en el documento WO04/030468. También en el documento WO04/026043 se describen procedimientos adecuados en los que se podría utilizar la asparaginasa de acuerdo con la invención.

Una forma intermedia del producto alimenticio se define en esta memoria como cualquier forma que se produce durante el procedimiento de producción antes de obtener la forma final del producto alimenticio. La forma intermedia puede comprender las materias primas individuales utilizadas y/o una mezcla de las mismas y/o mezclas con aditivos y/o coadyuvantes de elaboración, o una forma procesada subsiguientemente de los mismos.

Por ejemplo, para el producto alimenticio pan, las formas intermedias comprenden, por ejemplo, trigo, harina de trigo, la mezcla inicial de los mismos 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 con levadura y la masa parcialmente horneada. Por ejemplo, para varios productos a base de patata, copos de patata deshidratados o gránulos son productos intermedios, y masa de maíz es un producto intermedio para chips de tortilla.

El producto alimenticio puede estar hecho de al menos una materia prima que es de origen vegetal, por ejemplo patata, tabaco, café, cacao, arroz, cereales, por ejemplo trigo, granos de centeno, maíz, cebada, grañones, trigo sarraceno y avena. Trigo aquí y en lo que sigue pretende abarcar todas las especies conocidas del género *Triticum*, por ejemplo *aestivum*, *durum* y/o *spelta*. También los productos alimenticios hechos de más de una materia prima o productos intermedios están incluidos en el alcance de esta invención, por ejemplo productos alimenticios que comprenden tanto trigo (harina y/o almidón) como patata. Ejemplos de productos alimenticios en los que el proceso de acuerdo con la invención puede ser adecuado para cualquiera de los productos a base de harina - por ejemplo pan, pasteles, tarta, galletas, pretzels, bagels, pastel de miel holandesa, pastas, pan de jengibre, bizcocho de

jengibre y pan crujiente - y cualquier productos a base de patatas- por ejemplo patatas fritas, patatas a la inglesa, patatas fritas, croquetas.

Se conoce que las materias primas tales como las antes citadas contienen cantidades sustanciales de asparagina que está implicada en la formación de acrilamida durante la etapa de calentamiento del proceso de producción.

5 Alternativamente, la asparagina puede proceder de otras fuentes que no sean las materias primas, p. ej., a partir de hidrolizados de proteínas tales como extractos de levadura, hidrolizado de soja, hidrolizado de caseína y similares, que se utilizan como un aditivo en el proceso de producción de alimentos. Un proceso de producción preferido es la cocción del pan y otros productos horneados a partir de harina de trigo y/o harinas de origen de otros cereales. Otro proceso de producción preferido es la fritura de patatas fritas de rodajas de patata.

10 Etapas de calentamiento preferidas son aquellas en las que al menos una parte del producto alimenticio intermedio, p. ej., la superficie del producto alimenticio, está expuesta a temperaturas a las que se fomenta la formación de acrilamida, p. ej., 110°C o mayores, 120°C o temperaturas más altas. La etapa de calentamiento en el procedimiento de acuerdo con la invención puede llevarse a cabo en hornos, por ejemplo a una temperatura entre 180-220°C, tales como para la cocción del pan y otros productos de panadería, o en aceite tales como la fritura de patatas fritas, por
15 ejemplo, a 160-190°C.

Los productos alimenticios que pueden obtenerse por el procedimiento de la invención según se describe anteriormente en esta memoria o mediante el uso de la nueva asparaginasa según se describe anteriormente en esta memoria para producir productos alimenticios. Estos productos alimenticios se caracterizan por niveles de acrilamida significativamente reducidos en comparación con los productos alimenticios que pueden obtenerse
20 mediante los procesos de producción que no comprenden la adición de una o más enzimas en una cantidad que es eficaz en la reducción del nivel de aminoácidos que están implicados en la formación de acrilamida durante dicha etapa de calentamiento. El procedimiento de acuerdo con la invención se puede utilizar para obtener una disminución del contenido de acrilamida del producto alimenticio producido preferiblemente más de 50%, más preferiblemente más de 20%, incluso más preferiblemente 10% y lo más preferiblemente más de 5% en
25 comparación con un producto alimenticio obtenido con el procedimiento convencional.

Una aplicación adicional para las variantes de asparaginasa de acuerdo con la invención es que se va a emplear en la terapia de tumores en animales y seres humanos. El metabolismo de células tumorales requiere L-asparagina, que rápidamente puede ser degradada por parte de asparaginasas. La asparaginasa de acuerdo con la invención también se puede utilizar como coadyuvante en el tratamiento de alguna leucemia humana. La administración de
30 asparaginasa en animales de experimentación y seres humanos conduce a la regresión de determinados linfomas y leucemia. Por lo tanto, en una realización, la descripción se refiere a asparaginasas o una composición de acuerdo con la invención para uso como medicamento, p. ej., en el tratamiento de tumores, p. ej., en el tratamiento de linfomas o leucemia en animales o seres humanos.

Variantes de asparaginasa de acuerdo con la invención se pueden producir convenientemente en microorganismos.
35 En los procedimientos anteriores, es ventajoso el uso de asparaginasas que se obtienen por técnicas de ADN recombinante. Tales enzimas recombinantes tienen una serie de ventajas, tales como la producción a un precio de bajo coste, alto rendimiento, libre de agentes contaminantes tales como bacterias o virus pero también libre de toxinas bacterianas o de contaminación de otras actividades enzimáticas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> DSM IP Assets B.V.

<120> NUEVAS ASPARAGINASAS Y USOS DE LAS MISMAS

<130> 25899WO

5 <160> 4

<170> Patent In version 3.2

<210> 1

< 211> 1134

< 212> ADN

10 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Mutado de Aspergillus niger

<400> 1

atgccctca agcctatact actctctgct cttgcttctc ttgcctccgc cagccctctg	60
ctctactctc gtgccaccaa caccacctac gtcttcacca actccaacgg tctgaacttc	120
accagatga acaccacct ccccaacgtc accatcctgg ccaactggtg taccattgct	180
ggctcttccg cggacaacac tgccaccact ggctacactg ctggtgccat cggtatccag	240
accctgatcg atgctgttcc cgagatgctt gatggtgcca acgtcgctgg tgtccagggt	300
gccaacgctg gttccccga tgtcacctcc tccatcctgc tcagcatggc caagaccctc	360
aacgagggtg tctgcatga cccaccatg agcggtgccg tcatcaccca cggtaaccgac	420
accctcgagg agactgcttt cttcctggat gccaccgtca actgcccga gcccattggt	480
gttgttggtg ccatgcgcc cgccactgcc atctccgcc atggcccctt caacctcctc	540
caggctgtca cgttgctgc ttctcctgct gctcgtgacc gtggtgctct ggtcgtcatg	600
aacgacgta tcgtctctgc tttctacgcc tccaagacca acgccaacac catggacacc	660
ttcaaggccg ttgagatggg caacctcggg gccattgtct ccaacaagcc ctacttctac	720
tacctcctg tcaagccac tggcaagacc actggtgacg tccgcaacgt cacctccatc	780
ccccgtgctg acatcctgta cagctaccag gacatgcaga acgacaccct ctactctgcc	840
atcgacaacg gtgccaaagg tatcgtcatt gctggcagcg gtgctgggtc cgtcagcact	900
ggtttctccg acgccatoga tgacattgcc tccaagcact ccatcccat tgtcctcagc	960
actcgcaactg gcaacggcga ggttcctacc tcggatgtct cctccgacac tgccaccac	1020
atcgccctcg gtttctgaa cccccagaag gctcgtatcc tcttgggtct cctccttgc	1080

ES 2 550 362 T3

gagggcaagg gtttcaagga gatccgtgag gtcttcgcca aggtcaccgt tgcc

1134

<210> 2

< 211> 378

< 212> PRT

5 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Mutado de Aspergillus niger

<400> 2

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

Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Ser Arg Ala Thr Asn Thr Thr Tyr Val Phe
20 25 30

Thr Asn Ser Asn Gly Leu Asn Phe Thr Gln Met Asn Thr Thr Leu Pro
35 40 45

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

Asp Asn Thr Ala Thr Thr Gly Tyr Thr Ala Gly Ala Ile Gly Ile Gln
65 70 75 80

Thr Leu Ile Asp Ala Val Pro Glu Met Leu Asp Val Ala Asn Val Ala
85 90 95

Gly Val Gln Val Ala Asn Val Gly Ser Pro Asp Val Thr Ser Ser Ile
100 105 110

Leu Leu Ser Met Ala Lys Thr Leu Asn Glu Val Val Cys Asp Asp Pro
115 120 125

Thr Met Ser 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

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

ES 2 550 362 T3

Phe Asn Leu Leu Gln Ala Val Thr Val Ala Ala Ser Pro Ala Ala Arg
 180 185 190

Asp Arg Gly Ala Leu Val Val Met Asn Asp Arg Ile Val Ser Ala Phe
 195 200 205

Tyr Ala Ser Lys Thr Asn Ala Asn Thr Met Asp Thr Phe Lys Ala Val
 210 215 220

Glu Met Gly Asn Leu Gly Ala Ile Val Ser Asn Lys Pro Tyr Phe Tyr
 225 230 235 240

Tyr Pro Pro Val Lys Pro Thr Gly Lys Thr Thr Val Asp Val Arg Asn
 245 250 255

Val Thr Ser Ile Pro Arg Val Asp Ile Leu Tyr Ser Tyr Gln Asp Met
 260 265 270

Gln Asn Asp Thr Leu Tyr Ser Ala Ile Asp Asn Gly Ala Lys Gly Ile
 275 280 285

Val Ile Ala Gly Ser Gly Ala Gly Ser Val Ser Thr Gly Phe Ser Asp
 290 295 300

Ala Ile Asp Asp Ile Ala Ser Lys His Ser Ile Pro Ile Val Leu Ser
 305 310 315 320

Thr Arg Thr Gly Asn Gly Glu Val Pro Thr Ser Asp Val Ser Ser Asp
 325 330 335

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

Ile Leu Leu Gly Leu Leu Leu Ala Glu Gly Lys Gly Phe Lys Glu Ile
 355 360 365

Arg Glu Val Phe Ala Lys Val Thr Val Ala
 370 375

<210> 3

< 211> 1122

< 212> ADN

5 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Secuencia mutada de Aspergillus niger

<400> 3

ES 2 550 362 T3

```

atgccctca agcccatcct gctgtctgct cttgcctccc tggcctccgc cagccctctc    60
ctctactctc gcaccaccaa cgagaccttc gtcttcacca actccaacgg tetgaacttc    120
accagatga acaccaccct cccaacgctc accatcctgg ccactggtgg taccattgct    180
ggcagctctg cggacaacac tgccaccact ggctacactg ctggtgccat eggtatccag    240
accctcatcg atgccgttcc cgagatgctt gatgttgcca acgtcgctgg tgtccagggt    300
gccaacgctc gctctcccga tgtcaccagc agcatcctcc tctccatggc caagaccctc    360
aacgagggtg tctgcgatga cccaccatg getggtgccc tcatcaccga eggtaccgac    420
accctcgagg agactgcttt ctctcctggat gccactgtca actgcggcaa gccattggt    480
gttgttgggtg ccatgcgccc cgccactgcc atctccgccc acggccctt caacctctc    540
caggctgtca cegttgctgc ctccccctgct gctcgtgacc gtggtgctct tgttgtcatg    600
aacgaccgta tegtctctgc tttctacgtc tccaagacca acgccaacac catggacacc    660
ttcaaggccg ttgagatggg taacctgggt gctatagtat ccaacaagcc ctacttcttc    720
tacctcctg tcaagcccac tggcaagacc accttcgatg tccgcaacgt cacctccate    780
ccccgtgctg acatcctgta cagctaccag gacatgcaca acgacacct ctacgatgcc    840
attgacaacg gtgccaaggg tategtcatt gctggcagcg gtgctggctc egtctcttcc    900
ggtttctccg acgccattga ggacatcate tccaccact ccatcccoat tgtccagage    960
actcgcactg gcaacggcga ggttctctcc tccgacaggt cctcccagat tgctccgggt   1020
ttctgaacc eccagaagtc ccgtatcctc cttggtctcc tcttctgctc gggcaagggt   1080
ategaggaga tccgtgaggt ctctgccaag gtcggtgctg cc                               1122

```

<210> 4

< 211> 374

< 212> PRT

5 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Secuencia mutada 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

```

ES 2 550 362 T3

Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Ser Arg Thr Thr Asn Glu Thr Phe Val Phe
 20 25 30

Thr Asn Ser Asn Gly Leu Asn Phe Thr Gln Met Asn Thr Thr Leu Pro
 35 40 45

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

Asp Asn Thr Ala Thr Thr Gly Tyr Thr Ala Gly Ala Ile Gly Ile Gln
 65 70 75 80

Thr Leu Ile Asp Ala Val Pro Glu Met Leu Asp Val Ala Asn Val Ala
 85 90 95

Gly Val Gln Val Ala Asn Val Gly Ser Pro Asp Val Thr Ser Ser Ile
 100 105 110

Leu Leu Ser Met Ala Lys Thr Leu Asn Glu Val Val Cys Asp 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

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

Phe Asn Leu Leu Gln Ala Val Thr Val Ala Ala Ser Pro Ala Ala Arg
 180 185 190

Asp Arg Gly Ala Leu Val Val Met Asn Asp Arg Ile Val Ser Ala Phe
 195 200 205

Tyr Val Ser Lys Thr Asn Ala Asn Thr Met Asp Thr Phe Lys Ala Val
 210 215 220

Glu Met Gly Asn Leu Gly Ala Ile Val Ser Asn Lys Pro Tyr Phe Phe
 225 230 235 240

Tyr Pro Pro Val Lys Pro Thr Gly Lys Thr Thr Phe Asp Val Arg Asn

REIVINDICACIONES

1. Una asparaginasa, que es:

- a) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en una cualquiera de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4; o
- 5 b) un polipéptido que tiene al menos un 90% de homología con un polipéptido de acuerdo con a), y en donde el polipéptido tiene una anchura del perfil de actividad de pH que es al menos 4 unidades de pH de ancho, en donde la anchura del perfil de actividad del pH es la anchura del intervalo de pH calculada en unidades de pH en donde la enzima exhibe 50 a 100% de su actividad máxima; o
- 10 c) un polipéptido que es codificado por una secuencia de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 que codifica el polipéptido maduro.

2. Una asparaginasa de acuerdo con la reivindicación 1, en donde un polipéptido relacionado con SEQ ID NO: 2 de acuerdo con b) o c) comprende uno o más de Ala en la posición 25, Thr en la posición 28, Tyr en la posición 30, Ser en la posición 35, Leu en la posición 53, Ser en la posición 63, Ala en la posición 64, Asp en la posición 65, Asn en la posición 66, Ala en la posición 74, Ile en la posición 77, Ile en la posición 79, Gln en la posición 80, Thr en la posición 81, Glu en la posición 88, Pro en la posición 106, Val en la posición 108, Ser en la posición 111, Leu en la posición 114, Ala en la posición 117, Thr en la posición 119, Glu en la posición 122, Asp en la posición 126, Ser en la posición 131, Val en la posición 161, Ala en la posición 168, Gln en la posición 181, Pro en la posición 189, Ala en la posición 190, Leu en la posición 197, Val en la posición 205, Phe en la posición 208, Ala en la posición 210, Ser en la posición 211, Val en la posición 224, Asn en la posición 228, Ala en la posición 231, Ile en la posición 232, Val en la posición 233, Lys en la posición 236, Tyr en la posición 238, Tyr en la posición 240, Thr en la posición 250, Thr en la posición 251, Val en la posición 252, Val en la posición 254, Arg en la posición 255, Ser en la posición 259, Tyr en la posición 267, Gln en la posición 270, Gln en la posición 273, Ser en la posición 279, Asp en la posición 282, Asn en la posición 283, Lys en la posición 286, Ser en la posición 293, Ser en la posición 297, Ser en la posición 299, Gly en la posición 301, Ser en la posición 303, Asp en la posición 304, Asp en 307, Ile en la posición 309, Ala en la posición 310, Ser en la posición 311, Lys en la posición 312, His en la posición 313, Ser en la posición 314, Ile en la posición 317, Leu en la posición 319, Thr en la posición 321, Gly en la posición 324, Thr en la posición 330, Phe en la posición 345, Ala en la posición 351, Ala en la posición 360, Glu en la posición 361, Gly en la posición 364, Phe en la posición 365, Lys en la posición 366, Arg en la posición 369, Glu en la posición 370, Lys en la posición 374, Val en la posición 375 o Val en la posición 377, estando dichas posiciones definidas con referencia a SEQ ID NO: 2.

3. Una asparaginasa de acuerdo con la reivindicación 1, en donde un polipéptido relacionado con SEQ ID NO: 4 de acuerdo con b) o c) comprende uno o más de Ser en la posición 35, Leu en la posición 53, Ser en la posición 63, Ala en la posición 64, Asp en la posición 65, Asn en la posición 66, Ala en la posición 74, Ile en la posición 77, Ile en la posición 79, Gln en la posición 80, Thr en la posición 81, Glu en la posición 88, Pro en la posición 106, Val en la posición 108, Ser en la posición 111, Leu en la posición 114, Ala en la posición 117, Thr en la posición 119, Glu en la posición 122, Asp en la posición 126, Val en la posición 161, Ala en la posición 168, Gln en la posición 181, Pro en la posición 189, Ala en la posición 190, Leu en la posición 197, Val en la posición 205, Phe en la posición 208, Ser en la posición 211, Val en la posición 224, Asn en la posición 228, Ala en la posición 231, Ile en la posición 232, Val en la posición 233, Lys en la posición 236, Tyr en la posición 238, Thr en la posición 250, Thr en la posición 251, Val en la posición 254, Arg en la posición 255, Ser en la posición 259, Tyr en la posición 267, Gln en la posición 270, Asp en la posición 279, Asp en la posición 282, Asn en la posición 283, Lys en la posición 286, Ser en la posición 293, Ser en la posición 297, Ser en la posición 299, Ser en la posición 300, Gly en la posición 301, Ser en la posición 303, Asp en la posición 304, Ile en la posición 309, Ser en la posición 311, Thr en la posición 312, His en la posición 313, Ser en la posición 314, Ile en la posición 317, Thr en la posición 321, Gly en la posición 324, Pro en la posición 330, Glu en la posición 333, Gln en la posición 336, Phe en la posición 341, Ala en la posición 356, Gly en la posición 360, Glu en la posición 362, Arg en la posición 365, Glu en la posición 366, Lys en la posición 370, Val en la posición 371, Gly en la posición 372 o Val en la posición 373, estando dichas posiciones definidas con referencia a SEQ ID NO: 4.

4. Una asparaginasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que tiene un óptimo de pH entre 6 y 7 y/o que tiene una afinidad específica a un pH de al menos 5 que es mayor en comparación con la actividad específica de la asparaginasa de tipo salvaje de *A. niger* según se describe en el documento WO 2004/030468, medida bajo las mismas condiciones.

5. Una secuencia de ácido nucleico, que comprende:

- a) una secuencia de ADN que codifica la asparaginasa de acuerdo con una cualquiera de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4; o

- 5 b) una secuencia de ADN que codifica una asparaginasa que tiene al menos un 90% de homología con el polipéptido de acuerdo con una cualquiera de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4, y en donde la asparaginasa codificada tiene una anchura del perfil de actividad de pH que es al menos 4 unidades de pH de ancho, en donde la anchura del perfil de actividad del pH es la anchura del intervalo de pH calculada en unidades de pH en donde la enzima exhibe 50 a 100% de su actividad máxima; o
- c) una cadena complementaria de una secuencia de ADN de acuerdo con a) o b).
6. La secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el polipéptido codificado por dicha secuencia de ácido nucleico es una variante que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene uno o más truncamiento(s) y/o al menos una sustitución, delección y/o inserción de un aminoácido en comparación con la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4.
7. Una construcción de ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 5 ó 6, operativamente enlazada a una o más secuencias de control, capaces de dirigir la expresión de una asparaginasa en un huésped de expresión adecuado.
8. Un vector de expresión recombinante que comprende la construcción de ácido nucleico de la reivindicación 7.
- 15 9. Una célula huésped recombinante que comprende el vector de expresión de la reivindicación 8.
10. Un método para producir una asparaginasa, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 9 bajo condiciones que conduzcan a la producción de la asparaginasa, y recuperar la asparaginasa.
11. Una composición que comprende la asparaginasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 20 12. Uso de una asparaginasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o de una composición de acuerdo con la reivindicación 11 en la producción de un producto alimenticio.
13. Uso de una asparaginasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o de una composición de acuerdo con la reivindicación 11 para reducir la cantidad de acrilamida formada en un producto alimenticio térmicamente procesado basado en una materia prima con contenido en asparagina.
- 25 14. Procedimiento para la producción de un producto alimenticio que implica al menos una etapa de calentamiento, que comprende añadir una o más enzimas asparaginasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una composición de acuerdo con la reivindicación 11 a una forma intermedia de dicho producto alimenticio en dicho procedimiento de producción, en 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 alimenticio.
- 30 15. Uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el producto alimenticio se prepara a partir de uno o más de materia prima o producto intermedio.

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          10          20          30          40          50
WT A.NIGER  MPLKPILLSA LASLASASPL LYSRTTNETF VFTNANGLNF TOMNTTLFNV
SEQ ID NO:4  MPLKPILLSA LASLASASPL LYSRTTNETF VFTNSNGLNF TOMNTTLFNV
SEQ ID NO:2  MPLKPILLSA LASLASASPL LYSRATNTTY VFTNSNGLNF TOMNTTLFNV

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          60          70          80          90          100
WT A.NIGER  TIFATGGTIA GSDSSSTATT GYTSGAVGVL SLIDAVPSML DVANVAGVQV
SEQ ID NO:4  TILATGGTIA GSSADNTATT GYTAGAIGIQ TLIDAVPEML DVANVAGVQV
SEQ ID NO:2  TILATGGTIA GSSADNTATT GYTAGAIGIQ TLIDAVPEML DVANVAGVQV

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          110         120         130         140         150
WT A.NIGER  ANVGSEDTIS DILISMASKL NRVVCEDPIM AGAVITHGTD TLEETAPFLD
SEQ ID NO:4  ANVGSPDVTI SILLMAKTL NEVVCDPPTM AGAVITHGTD TLEETAPFLD
SEQ ID NO:2  ANVGSPDVTI SILLMAKTL NEVVCDPPTM SGAVITHGTD TLEETAPFLD

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          160         170         180         190         200
WT A.NIGER  ATVNCQKPIV IVGAMRPSTA ISADGPFNLL EAVTVAASTS ARDRGAMVVM
SEQ ID NO:4  ATVNCQKPIV VVGAMRPATA ISADGPFNLL QAVTVAASPA ARDRGALVVM
SEQ ID NO:2  ATVNCQKPIV VVGAMRPATA ISADGPFNLL QAVTVAASPA ARDRGALVVM

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          210         220         230         240         250
WT A.NIGER  NDRIASAYYV TKTNANTMDT FKAMEMGYLG EMISNTPFFF YPPVKPTGKV
SEQ ID NO:4  NDRIVSAFYV SKTNANTMDT FKAVEMGNLG AIVSNKPYFF YPPVKPTGKT
SEQ ID NO:2  NDRIVSAFYA SKTNANTMDT FKAVEMGNLG AIVSNKPYFY YPPVKPTGKT

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          260         270         280         290         300
WT A.NIGER  AFDITNVTEI PRVDILFSYE DMHNDTLYNA ISSGAQGIVI AGAGAGGVTT
SEQ ID NO:4  TFDVRNVTSI PRVDILYSYQ DMHNDTLYDA IDNGAKGIVI AGSGAGSVSS
SEQ ID NO:2  TVDVRNVTSI PRVDILYSYQ DMQNDTLYSA IDNGAKGIVI AGSGAGSVST

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          310         320         330         340         350
WT A.NIGER  SFNEAIEDVI NRLEIPVVSQ MRTVNCEVPL SDVSSDTATH IASGYLNPQK
SEQ ID NO:4  GFSDAIEDII STHSIPVQS  TRTGNGEVPP SDESS----Q IASGFLNPQK
SEQ ID NO:2  GFSDAIDDIA SKHSIPVLS  TRTGNGEVPT SDVSSDTATH IASGFLNPQK

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          360         370
WT A.NIGER  SRILLGILLS QGKNITEIAD VFALGTDA
SEQ ID NO:4  SRILLGILLA QGKGIIEIRE VFAKVGVA
SEQ ID NO:2  ARILLGILLA EGKGFKEIRE VFAKVTVV

```

Figura 1