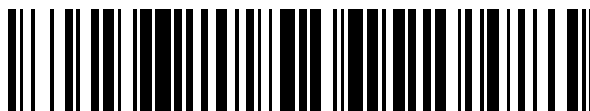


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 682 520**

51 Int. Cl.:

C12N 9/42 (2006.01)

D21C 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.11.2014** **PCT/FR2014/052985**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.05.2015** **WO15075392**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2014** **E 14821724 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018** **EP 3071693**

54 Título: **Variantes de la endoglucanasa con actividad mejorada y sus usos**

30 Prioridad:

22.11.2013 FR 1361511

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

20.09.2018

73 Titular/es:

IFP ENERGIES NOUVELLES (33.3%)

1 & 4 avenue de Bois-Préau

92500 Rueil-Malmaison, FR;

PROTEUS (33.3%) y

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE

SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (33.3%)

72 Inventor/es:

MARGEOT, ANTOINE;

BLANQUET, SENTA;

PERSILLON, CÉCILE;

AYRINHAC, CÉLINE;

ULLMANN, CHRISTOPHE;

BONZOM, OLIVIER;

FORT, SÉBASTIEN;

ARMAND, SYLVIE;

LENON, MARINE y

PETIT, MAUD

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 682 520 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Variantes de la endoglucanasa con actividad mejorada y sus usos

5 Estado de la técnica

La posibilidad de producir etanol a partir de celulosa ha recibido una gran atención debido a la disponibilidad de grandes cantidades de materia prima así como al interés del etanol como combustible. Las materias primas naturales celulósicas para tal procedimiento se denominan con el término "biomasa". Numerosos tipos de biomasa, por ejemplo madera, residuos agrícolas, cultivos herbáceos y desechos sólidos municipales, se han considerado como posibles materias primas para la producción de biocombustibles. Estas materias están constituidas principalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina.

La celulosa es un polímero compuesto por moléculas de glucosa unidas por enlaces beta 1-4, que son muy resistentes a la degradación o a la despolimerización. Una vez que la celulosa se convierte en glucosa, ésta se fermenta fácilmente a biocombustible, por ejemplo etanol, utilizando levadura.

Los métodos más antiguos estudiados para convertir celulosa en glucosa se basan en la hidrólisis ácida. Este procedimiento puede realizarse en presencia de ácidos concentrados o diluidos. Sin embargo, varios inconvenientes tales como la escasa recuperación del ácido cuando se utilizan ácidos concentrados y la baja producción de glucosa en el contexto del uso de ácidos diluidos son perjudiciales para la economía del procedimiento de hidrólisis ácida.

Con el fin de superar las desventajas del procedimiento de hidrólisis ácida, los procedimientos de conversión de celulosa han aumentado más recientemente en la hidrólisis enzimática, utilizando enzimas tipo celulasa. Sin embargo, esta hidrólisis enzimática de la biomasa lignocelulósica (por ejemplo, celulosa) presenta el inconveniente de ser un procedimiento industrial costoso. Por lo tanto, es necesario utilizar cepas de microorganismos que secretan celulasa cada vez más eficientes. Como tal, muchos microorganismos constan de enzimas que hidrolizan la celulosa, tales como hongos *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Humicola*, *Fusarium*, así como bacterias tales como *Thermomonospora*, *Bacillus*, *Cellulomonas* y *Streptomyces*. Las enzimas secretadas por estos microorganismos poseen tres tipos de actividades útiles en la conversión de celulosa en glucosa y se dividen en tres grupos: las endoglucanasas, que atacan las fibras de celulosas al azar de forma interna, las exoglucanasas que atacarán los extremos de las fibras liberando celobiosa y las β -glucosidasas que hidrolizarán esta celobiosa en glucosa. Otras clases de enzimas tales como hemicelulasas o la clase de enzimas recientemente descubierta de polisacáridos monooxigenasas también pueden desempeñar un papel en la eficacia de la hidrólisis.

Existe un fuerte interés industrial en reducir el costo de la hidrólisis enzimática, y esta reducción implica el uso de una dosis reducida de enzimas y, por lo tanto, cócteles enzimáticos más eficaces. En consecuencia, varias solicitudes de patente describen enzimas naturales con capacidades superiores a las de *Trichoderma reesei*, o variantes mejoradas por ingeniería genética. Se pueden mencionar las solicitudes de patente US2010304464, WO2010066411 y WO2013029176 con respecto a las exoglucanasas, las solicitudes WO2007109441, WO2012149192, WO2008088724, WO2010135836 o WO2010022518 con respecto a las endoglucanasas, las solicitudes WO2010029259, WO2010135836 o WO2010022518 con respecto a las β -glucosidasas, o las solicitudes WO12135659, WO12149344 con respecto a los polisacáridos monooxigenasas.

La solicitud WO2011/153516 describe asimismo cepas de levaduras que expresan enzimas sacarolíticas.

Las enzimas que hidrolizan la biomasa lignocelulósica se clasifican en el sistema CAZy (Cantarel, B.L., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., y Henrissat, B. (2009). *The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. Nucleic acids research*, 37, D233-8) en criterios principalmente estructurales. Las endoglucanasas pueden pertenecer a familias GH 5, 6, 7, 8, 9, 12, 16, 18, 19, 26, 44, 45, 48, 51, 74 y 124.

Para que una hidrólisis de la biomasa lignocelulósica sea eficiente y económicamente rentable, la mezcla enzimática debe tener proporciones equilibradas de actividades enzimáticas diversas (entre otras, pero no exclusivamente, exoglucanasas, endoglucanasas, xilanasas y β -glucosidasas). A modo de ejemplo, en las mezclas nativas de *Trichoderma reesei*, se observa generalmente la presencia de 60-70 % de exoglucanasas, 15-20 % de endoglucanasas, algunos porcentajes de hemicelulasas y aproximadamente 5-10 % de β -glucosidasas. Esta mezcla es adecuada para hidrolizar la mayoría de los sustratos pretratados (p. ej., tipo paja de trigo explotada al vapor en condiciones ácidas) con rendimientos aceptables. En resumen, el aumento en la actividad de la endoglucanasa no debe hacerse a expensas de otras actividades enzimáticas. Las especificidades funcionales de estas enzimas son hoy en día poco conocidas. El genoma de *Trichoderma reesei* consta de al menos 3 enzimas principales, procedentes de las familias 7 (EG1, cel7b), 5 (EG2, cel5a) y 12 (EG3, Ce112a). Las enzimas EG1 y EG2 son las principales endoglucanasas y pueden representar hasta 10-20 % en masa del cóctel de enzimas completo producido por *T. reesei*.

Las endoglucanasas (EC 3.2.1.4), las primeras enzimas que actúan sobre la celulosa, son conocidas por tener un

papel principal en la hidrólisis al aumentar el número de sitios que pueden atacar las exoglucanasas al tiempo que disminuye el grado de polimerización de las microfibrillas atacadas. Trabajos recientes (Szijártó, N., Siika-aho, M., Sontag-Strohm, T., y Viikari, L. (2011). *Liquefaction of hydrothermally pretreated wheat straw at high-solids content by purified Trichoderma enzymes*. *Bioresource technology*, 102(2), 1968-74) destacan su papel en la reducción de la viscosidad de la biomasa durante las primeras horas de hidrólisis. Esta disminución en la viscosidad puede tener un impacto muy significativo en los costos operativos del procedimiento.

El problema de la viscosidad se ve agravado en el caso de procedimientos que obligan a utilizar una temperatura baja, tal como sacarificación y fermentación simultáneas (SFS), que involucra tanto a las enzimas que hidrolizan la biomasa como al microorganismo que convierte los monómeros de azúcares en etanol.

La hidrólisis y la fermentación se pueden llevar a cabo de acuerdo con diferentes esquemas. El más común consiste en una hidrólisis y una fermentación separadas (HFS) (*SHF-Separate Hydrolysis and Fermentation*). Este método permite optimizar cada etapa manteniendo condiciones óptimas de reacción. Esta fermentación se efectúa de manera extemporánea, a una temperatura comprendida entre aproximadamente 28 °C y aproximadamente 30 °C, mientras que la hidrólisis tiene lugar generalmente a una temperatura de al menos 45 °C. Sin embargo, en HFS, los azúcares liberados al final de reacción están presentes a una concentración muy alta y causan una inhibición de las enzimas, ralentizando la eficacia del procedimiento. Para evitar estos inconvenientes, se puede prever otro tipo de procedimiento. En SFS, las dos etapas (hidrólisis y fermentación de hexosas) tienen lugar de manera simultánea, evitando la acumulación de azúcares en concentraciones inhibitorias para las enzimas. Los costos de inversión también se reducen mediante el uso de un solo reactor. La tasa de hidrólisis es más elevada como resultado de la ausencia de inhibición ya que los azúcares liberados se utilizan inmediatamente para la fermentación de etanol. En este método, la temperatura del reactor constituye necesariamente un compromiso entre las temperaturas óptimas de hidrólisis y fermentación, normalmente entre aproximadamente 30 °C y aproximadamente 35 °C. Sin embargo, a dicha temperatura, la actividad de las enzimas celulolíticas disminuye aproximadamente un 30 %.

La SFS también permite la expresión de enzimas que degradan la celulosa en el organismo que fermenta los azúcares, lo que permite limitar, o en un caso extremo, suprimir el uso de enzimas producidas en una etapa separada.

En consecuencia, la obtención de enzimas que mantienen una actividad endoglucanasa eficaz a temperaturas óptimas de hidrólisis y fermentación (es decir, entre 30 °C y 50 °C) mientras se mantiene la proporción del conjunto de enzimas de la mezcla sería una ganancia significativa para el procedimiento de conversión de biomasa lignocelulósica en biocombustible.

Objeto de la invención

Los inventores han desarrollado un polipéptido que tiene una actividad endoglucanasa mejorada, especialmente con respecto a la actividad endoglucanasa de la proteína salvaje EG2 de la secuencia SEQ ID NO: 2. EG2 corresponde a la endoglucanasa 2 de *Trichoderma reesei*.

Con esta intención, los solicitantes han tenido el gran mérito de encontrar, después de numerosas investigaciones, un polipéptido aislado o purificado que tiene una actividad endoglucanasa mejorada con respecto a la actividad endoglucanasa de la proteína salvaje EG2 (SEQ ID NO: 2).

De acuerdo con la descripción, el polipéptido se selecciona entre el grupo que consiste en:

- i) una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 34;
- ii) una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de al menos 70 %, preferentemente 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 %, con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 34.

La invención se define en las reivindicaciones.

El porcentaje de identidad de una secuencia dada con respecto a SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 34, corresponde al número de residuos idénticos entre esta secuencia dada y SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 34 dividido por el número de residuos en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 34. Cuando se utiliza la base de datos GenomeQuest, dicho porcentaje de

identidad con respecto a SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 34 corresponde al porcentaje de identidad de interrogación (% *id Query*), en el que interrogación corresponde a la secuencia SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 34.

En otro modo de realización, el polipéptido de la invención como se descrito anteriormente se caracteriza por que su expresión en un organismo fermentativo es al menos igual a la expresión de la proteína salvaje EG2 (SEQ ID NO: 2).

Los expertos en la materia podrán determinar por ejemplo el aumento, o en otras palabras, la mejora de la actividad enzimática utilizando el sustrato de carboximetilcelulosa (CMC) o con un sustrato cromogénico (p-nitrofenil glicósido). La actividad enzimática se revelará, respectivamente, mediante un ensayo colorimétrico de los azúcares reductores o el nitrofenol liberado.

Preferentemente, el polipéptido de la invención tiene una actividad enzimática mejorada de al menos 10 %, preferentemente al menos 20 %, preferentemente al menos 30 %, con respecto a la actividad endoglucanasa de la proteína EG2 de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2.

Un ejemplo de un protocolo, que podrá utilizar un experto en la materia para determinar si un polipéptido de acuerdo con la invención presenta una actividad enzimática mejorada en relación con la de la proteína salvaje EG2 (SEQ ID NO: 2), es el siguiente:

- formación de un cultivo madre de *E. coli* que expresa un polipéptido de acuerdo con la invención durante toda la noche a 37 °C;
- siembra de un medio de cultivo LB con 1 % de cultivo madre a 37 °C hasta que se obtenga una densidad óptica de 0,4;
- cultivo de dichas células a 20 °C durante 18 h;
- centrifugación durante 5 minutos a 7.900 rpm;
- resuspensión de residuos celulares con tampón citrato fosfato 100 mM a pH 5 que contiene 1 mg/ml de lisozima (DO₆₀₀ final 100);
- incubación de las células resuspendidas durante 30 minutos en hielo;
- lisis de células en 3 ciclos de congelación/descongelación;
- fraccionamiento de ADN por sometimiento a ultrasonidos;
- centrifugación durante 30 minutos a 13.000 rpm;
- incubación de 100 µl de sobrenadante de ruptura diluido 50 veces con 100 µl de tampón citrato fosfato 100 mM a pH 5 que contiene 1 % de CMC durante 1 h a 35 y 50 °C;
- eliminación de 100 µl de reacción;
- adición de 100 µl de reactivo DNS (Miller, 1959);
- incubación durante 5 minutos a 100 °C;
- incubación durante 3 minutos en hielo;
- centrifugación durante 10 minutos a 3.000 rpm;
- lectura de la densidad óptica a 540 nm en 150 µl de sobrenadante.

La invención también tiene por objeto un ácido nucleico purificado o aislado que codifica al menos un polipéptido de acuerdo con la invención como se ha descrito anteriormente.

La TABLA 1 a continuación comprende las identificaciones de secuencias nucleicas y peptídicas para los genes EG2, los genes de las endoglucanasas 2 putativas de *Botryotinia fuckeliana* (gen BF) y la endoglucanasa 2 putativa de *Sclerotinia sclerotiorum* (gen SS), así como para las secuencias de ácidos nucleicos y polipéptidos de la invención y la descripción.

De acuerdo con la descripción, dicho ácido nucleico purificado o aislado se puede seleccionar entre las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 33.

TABLA 1

Clones	Ácido nucleico	Polipéptido
EG2 (salvaje)	SEQ ID NO :1	SEQ ID NO :2
37D12	SEQ ID NO :3	SEQ ID NO :4
45A7	SEQ ID NO :5	SEQ ID NO :6
46H1	SEQ ID NO :7	SEQ ID NO :8
50F10	SEQ ID NO :9	SEQ ID NO :10

Clones	Ácido nucleico	Polipéptido
108G5	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO :12
140F7	SEQ ID NO :13	SEQ ID NO :14
146C4	SEQ ID NO :15	SEQ ID NO :16
149E4	SEQ ID NO :17	SEQ ID NO :18
173C6	SEQ ID NO :19	SEQ ID NO :20
191H11	SEQ ID NO :21	SEQ ID NO :22
222E1	SEQ ID NO :23	SEQ ID NO :24
225C7	SEQ ID NO :25	SEQ ID NO :26
227C4	SEQ ID NO :27	SEQ ID NO :28
229D1	SEQ ID NO :29	SEQ ID NO :30
231C9	SEQ ID NO :31	SEQ ID NO :32
330F9	SEQ ID NO :33	SEQ ID NO :34
Gen BF	SEQ ID NO :35	SEQ ID NO :36
Gen SS	SEQ ID NO :37	SEQ ID NO :38

La invención también se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la invención como se ha descrito anteriormente.

- 5 De acuerdo con la invención, se entiende por "vector" cualquier secuencia de ADN en la que es posible insertar fragmentos de ácido nucleico extraño, los vectores permiten introducir ADN extraño en una célula huésped. Se puede citar de manera no exhaustiva como vectores: plásmidos, cósmidos, cromosomas artificiales de levaduras (YAC), cromosomas artificiales de bacterias (BAC), cromosomas artificiales derivados del bacteriófago P1 (PAC) o vectores derivados de virus.

- 10 De acuerdo con la invención, el ácido nucleico como se ha descrito anteriormente puede unirse operativamente a un promotor, un terminador o cualquier otra secuencia necesaria para su expresión en la célula huésped.

- 15 El vector de acuerdo con la invención también podrá llevar un marcador de selección. Se entiende por "marcador de selección" un gen cuya expresión confiere a las células que lo contienen una característica que les permite ser seleccionadas. Se trata por ejemplo de un gen de resistencia a antibióticos.

- 20 La invención tiene también por objeto una célula huésped aislada que comprende al menos uno de los polipéptidos de acuerdo con la invención como se ha descrito previamente, al menos uno de los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención como se ha descrito anteriormente o al menos uno de los vectores de acuerdo con la invención como se ha descrito anteriormente.

- 25 Los expertos en la materia pueden introducir uno de los polipéptidos, uno de los ácidos nucleicos o uno de los vectores de acuerdo con la invención como se ha descrito previamente en la célula huésped de acuerdo con la invención por métodos convencionales bien conocidos. Por ejemplo, se puede mencionar el tratamiento con cloruro de calcio, la electroporación, el uso de una pistola de partículas.

- 30 De acuerdo con un modo de realización, un experto en la materia puede introducir en la célula huésped de acuerdo con la invención y mediante métodos convencionales, varias copias de un ácido nucleico de acuerdo con la invención que codifica un polipéptido de acuerdo con la invención que tiene una actividad endoglucanasa mejorada de acuerdo con la invención.

- 35 De acuerdo con un modo de realización, la célula huésped aislada de acuerdo con la invención como se ha descrito anteriormente se selecciona entre *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Neurospora*, *Humicola*, *Myceliophthora*, *Chrysosporium*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Thermomomouspora*, *Bacillus*, *Pseudomouas*, *Escherichia*, *Clostridium*, *Cellulomouas*, *Streptomyces*, *Yarrowia*, *Pichia* y *Saccharomyces*.

- 40 De acuerdo con un modo de realización preferente, la célula huésped aislada de acuerdo con la invención como se ha descrito anteriormente se selecciona entre *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viridae*, *Trichoderma koningii*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus wentii*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus phoenicis*, *Myceliophthora thermopila*, *Chrysosporium lucknowense*, *Neurospora crassa*, *Humicola grisae*, *Penicillium pinophilum*, *Penicillium oxalicum*, *Escherichia coli*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium saccharolyticum*, *Clostridium benjerinckii*, *Clostridium butylicum*, *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica* y *Saccharomyces cerevisiae*.

- 45 De acuerdo con un modo de realización preferente, la célula huésped aislada de acuerdo con la invención como se ha descrito anteriormente se selecciona entre *Trichoderma reesei* y *Saccharomyces cerevisiae*.

- La invención también tiene por objeto el uso de uno cualquiera de los polipéptidos de acuerdo con la invención descritos anteriormente para la hidrólisis de celulosa.

La invención también tiene por objeto el uso de uno cualquiera de los polipéptidos de acuerdo con la invención descritos anteriormente para la producción de biocombustible.

De acuerdo con la invención, el término biocombustible puede definirse como cualquier producto resultante de la transformación de biomasa y puede utilizarse con fines energéticos. Por una parte y sin querer limitarse, se puede hacer citar a modo de ejemplo biogás, productos que pueden incorporarse (posiblemente después de una transformación posterior) en un combustible o ser un combustible exclusivo, como los alcoholes (etanol, butanol y/o isopropanol de acuerdo con el tipo de organismo fermentativo utilizado), disolventes (acetona), ácidos (butírico), lípidos y sus derivados (ácidos grasos de cadenas cortas o largas, ésteres de ácidos grasos), así como hidrógeno.

- 10 Preferentemente, el biocombustible de acuerdo con la invención es un alcohol, por ejemplo etanol, butanol y/o isopropanol. Más preferentemente, el biocombustible de acuerdo con la invención es etanol.

En otro modo de realización, el biocombustible es biogás.

- 15 En otro modo de realización, el producto es una molécula de interés para la industria química, como por ejemplo, otro alcohol tal como 1,2-propanodiol, 1,3-propanodiol, 1,4-butanodiol, 2,3-butanodiol, ácidos orgánicos como ácido acético, propiónico, acrílico, butírico, succínico, málico, fumárico, cítrico, itacónico o hidroxiácidos como ácido glicólico, hidroxipropiónico o láctico.

- 20 A continuación se describe un modo de realización de producción de un cóctel enzimático útil para la hidrólisis de lignocelulosa. Las cepas de hongos filamentosos, preferentemente *Trichoderma*, más preferentemente *T. reesei*, capaces de expresar al menos un polipéptido de acuerdo con la invención se cultivan en fermentadores, en presencia de un sustrato carbonado, tal como lactosa o glucosa, seleccionado para el crecimiento del microorganismo. En un modo de realización, este sustrato carbonado, de acuerdo con su naturaleza, se introduce en el fermentador antes de la esterilización o se esteriliza por separado y se introduce en el fermentador después de la esterilización de este último para obtener una concentración inicial de 20 a 35 g/l.

- Posteriormente se añade una solución acuosa que contiene el sustrato seleccionado para la producción de las enzimas. Una composición enzimática que actúa sobre la biomasa lignocelulósica producida por los hongos se recupera finalmente por filtración del medio de cultivo. En esta composición, se encuentran, en particular, β -glucosidasa, exoglucanasa y endoglucanasa de acuerdo con la invención. En un modo de realización, la solución acuosa que contiene el sustrato seleccionado para la producción de las enzimas se prepara a una concentración de 200-250 g/l y contiene además un sustrato inductor tal como lactosa. Esta solución acuosa se inyecta después del agotamiento del sustrato carbonado inicial a fin de proporcionar una cantidad optimizada, comprendida entre 35 y 45 mg/g de células ("fed batch" (proceso semicontinuo)). Durante esta fase de "proceso semicontinuo", la concentración residual de azúcar en el medio de cultivo es inferior a 1 g/l y las enzimas que actúan sobre la biomasa lignocelulósica son secretadas por el hongo. Estas últimas pueden recuperarse por filtración del medio de cultivo.

- La invención tiene por objeto una composición enzimática capaz de actuar sobre la biomasa lignocelulósica, siendo dicha composición enzimática es producida preferentemente por hongos filamentosos y comprende al menos un polipéptido que tiene una actividad endoglucanasa mejorada con respecto a la actividad endoglucanasa de la proteína salvaje EG2. Por "hongos filamentosos" se entiende especialmente *Trichoderma*, más preferentemente *T. reesei*.

- 45 Finalmente, la invención tiene por objeto un procedimiento de producción de biocombustible a partir de biomasa que comprende las siguientes etapas sucesivas:

- poner suspensión en fase acuosa la biomasa que se va a hidrolizar;
- hidrólisis en presencia de una composición enzimática de la biomasa lignocelulósica como se ha descrito anteriormente para producir un hidrolizado que contiene glucosa;
- fermentación de la glucosa del hidrolizado para producir un mosto de fermentación;
- separación del biocombustible del mosto de fermentación.

- En un modo de realización, la biomasa que se va a hidrolizar se pone en suspensión en fase acuosa a razón de 6 a 40 % de materia seca, preferentemente 20 a 30 %. El pH se ajusta entre 4 y 5,5; preferentemente entre 4,8 y 5,2 y la temperatura entre 40 y 60 °C, preferentemente entre 45 y 50 °C. La reacción de hidrólisis se inicia mediante la adición de la composición enzimática que actúa sobre la biomasa lignocelulósica; la cantidad habitualmente utilizada es de 10 a 30 mg de proteínas excretadas por gramo de sustrato pretratado o menos. La reacción dura generalmente de 15 a 48 horas. La reacción se controla determinando los azúcares liberados, especialmente la glucosa. La solución de azúcares se separa de la fracción sólida no hidrolizada, constituida esencialmente de lignina, por filtración o centrifugación y luego se trata en una unidad de fermentación.

- En un modo de realización, el biocombustible puede separarse del mosto de fermentación, por ejemplo por destilación.

- Otro objeto de la invención es un procedimiento de producción de biocombustible a partir de la biomasa,

caracterizado por que comprende las siguientes etapas sucesivas:

- poner suspensión en fase acuosa la biomasa que se va a hidrolizar;
- adición simultánea de una composición enzimática como se ha definido anteriormente y de un organismo fermentativo, preferentemente a una temperatura comprendida entre 30 °C y 35 °C, para producir un mosto de fermentación;
- separación del biocombustible del mosto de fermentación.

Preferentemente, la composición enzimática y el organismo fermentativo se añaden simultáneamente y luego se incuban a una temperatura comprendida entre 30 °C y 35 °C para producir un mosto de fermentación.

De acuerdo con este modo de realización, la celulosa presente en la biomasa se convierte en glucosa, y al mismo tiempo, en el mismo reactor, el organismo fermentativo (por ejemplo, una levadura) convierte la glucosa en el producto final de acuerdo con un procedimiento de SFS (sacarificación y fermentación simultáneas) (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*) conocido por los expertos en la materia. Dependiendo de las capacidades metabólicas e hidrolíticas del organismo fermentativo, el buen progreso de la operación puede requerir la adición de una cantidad mayor o menor de mezcla celulolítica exógena.

En otro modo de realización, el organismo fermentativo también produce el polipéptido objeto de la invención por secreción o en la superficie de su célula, opcionalmente junto con otras enzimas que actúan sobre la biomasa lignocelulósica, limitando o suprimiendo así la necesidad de enzimas producidas por el hongo filamentoso. Preferentemente, el organismo fermentativo es una célula huésped como se ha descrito anteriormente.

Por lo tanto, preferentemente, la invención tiene por objeto un procedimiento de producción de biocombustible a partir de biomasa, que comprende las siguientes etapas sucesivas:

- poner en suspensión en fase acuosa la biomasa que se va a hidrolizar;
- adición de una o más células huésped como se ha descrito anteriormente, con un organismo fermentativo y/o una composición enzimática como se ha descrito anteriormente, para producir un mosto de fermentación;
- separación del biocombustible del mosto de fermentación.

Preferentemente, las células huésped con la composición enzimática y/o el organismo fermentativo se añaden e incuban posteriormente a una temperatura comprendida entre 30 °C y 35 °C para producir un mosto de fermentación.

El uso del polipéptido de acuerdo con la invención que presenta una mejor actividad endoglucanasa de acuerdo con la presente invención presenta así la ventaja de obtener un mejor rendimiento de producción de glucosa. Por lo tanto, la presente invención permite utilizar menos enzima que antes, lo que presenta una ventaja desde el punto de vista económico.

Descripción de las figuras

Otros aspectos, objetos, ventajas y características de la invención se expondrán tras la lectura de la siguiente descripción no restrictiva que describe modos de realización preferentes de la invención proporcionados mediante ejemplos y FIGURAS.

La FIGURA 1 es un gráfico que representa la hidrólisis de *p*-nitrofenil- β -celotriosida (pNPC3) por la endoglucanasa de referencia EG2 (SEQ ID NO: 2) y los mutantes 222E1 y 225C7 (respectivamente SEQ ID NO: 24 y 26) secretados en el medio de cultivo de las cepas *Sca*-EG2, *Sca*-222E1 y *Sca*-225C7, respectivamente.

La FIGURA 2 es un gráfico que representa la hidrólisis de CMC al 1 % por la endoglucanasa de referencia EG2 (SEQ ID: 2) y los mutantes 222E1 y 225C7 (respectivamente SEQ ID NO: 24 y 26) secretados en el medio de cultivo de cepas *Sca*-EG2, *Sca*-222E1 y *Sca*-225C7, respectivamente.

La FIGURA 3 es un gráfico que representa los resultados de HFS para el cóctel resultante de la cepa 146C4/7, un cóctel de referencia producido por la cepa CL847 Δ EG1 (Δ EG1) suplementado con β -glucosidasa y otro cóctel de referencia producido por la cepa CL847 Δ EG1 retransformada con el gen de referencia EG2 (Δ EG1cEG2) suplementado con β -glucosidasa.

La FIGURA 4 es un gráfico que presenta los resultados de HFS para el cóctel de la cepa 222E1/1 (SEQ ID NO: 24) y el cóctel resultante de la cepa 225C7/7 (SEQ ID NO: 26), un cóctel de referencia producido por la cepa CL847 Δ EG1 (Δ EG1) suplementado con β -glucosidasa y otro cóctel de referencia producido por la cepa CL847 Δ EG1 retransformada con el gen de referencia EG2 (Δ EG1cEG2) suplementado con β -glucosidasa.

La FIGURA 5 es un gráfico que presenta los resultados de SFS para el cóctel resultante de la cepa 146C4/7 (SEQ ID NO: 16) y para el cóctel resultante de la cepa 191H11/9 (SEQ ID NO 22), un cóctel de referencia

producido por la cepa CL847 Δ EG1 (Δ EG1) suplementado con β -glucosidasa y otro cóctel de referencia producido por la cepa CL847 Δ EG1 retransformada con el gen de referencia EG2 (Δ EG1cEG2) suplementado con β -glucosidasa.

La FIGURA 6 es un gráfico que presenta la media de los resultados de SFS para los 3 cócteles resultantes de las cepas 222E1/1, 222E1/2 y 222E1/7 (SEQ ID NO: 24) y los resultados para el cóctel resultante de la cepa 225C7/7 (SEQ ID NO: 26), un cóctel de referencia producido por la cepa CL847 Δ EG1 (Δ EG1) suplementado con β -glucosidasa y otro cóctel de referencia producido por la cepa CL847 Δ EG1 retransformada con el gen de referencia EG2 (Δ EG1cEG2) suplementado con β -glucosidasa.

Descripción detallada de la invención

Ejemplos

EJEMPLO 1: Evolución por transposición en L

La secuencia del gen de endoglucanasa 2 (EG2) de *Trichoderma reesei* se sometió a un giro de transposición en L de acuerdo con el procedimiento patentado descrito en el documento EP1104457B1 con los genes de endoglucanasa 2 putativa de *Botryotinia fuckeliana* (gen BF) y la endoglucanasa 2 putativa de *Sclerotinia sclerotiorum* (gen SS) que presenta cada uno un 64 % de identidad con el gen de referencia EG2 (SEQ ID NO: 1).

1 - Identificación sistemática de alto rendimiento

Se desarrolló un ensayo de identificación sistemática de alto rendimiento para seleccionar los mejores clones resultantes de la transposición en L, es decir, aquellos con al menos un 20 % de mejora en la actividad endoglucanasa en comparación con la enzima de *T. reesei*.

El ensayo de identificación sistemática de alto rendimiento se realizó de acuerdo con las siguientes etapas:

- aislamiento en agar de clones de *E. coli* que expresan las variantes de la enzima recombinante de acuerdo con la invención y precultivados en medio LB de dichas colonias durante la noche a 37 °C;
- inoculación de un medio LB al 6 % con el precultivo y luego incubación durante 5 h a 37 °C y 17 h a 20 °C;
- centrifugación durante 10 minutos a 3.000 rpm;
- lisis de las células por adición de 80 μ l de una solución de lisozima a 1 mg/ml en tampón citrato fosfato 0,1 M a pH 5;
- incubación durante 4 h a temperatura ambiente;
- adición de 80 μ l de tampón citrato fosfato 0,1 M pH 5 que contiene 1 % de carboximetilcelulosa;
- incubación durante 3 h a 35 °C;
- centrifugación durante 10 minutos a 3.000 rpm;
- eliminación de 100 μ l de sobrenadante;
- adición de 100 μ l de reactivo DNS;
- incubación durante 10 minutos a 100 °C y luego durante 5 minutos en hielo;
- lectura de la DO a 540 nm en 120 μ l.

En estas condiciones de identificación sistemática, se ha descubierto una mejora de la actividad endoglucanasa (aumento de la DO a 540 nm) con respecto a la enzima de referencia EG2 (SEQ ID NO: 2) en los clones 37D12, 45A7, 46H1, 50F10, 108G5, 140F7, 146C4, 149E4, 173C6, 191H11, 222E1, 225C7, 227C4, 229D1, 231C9 y 330F9.

2 - Determinación de la mejora de la actividad endoglucanasa

2-1/Sobre el sustrato de carboximetilcelulosa (CMC)

Para estimar el kcat de los clones 37D12, 45A7, 46H1, 50F10, 108G5, 140F7, 146C4, 149E4, 173C6, 191H11, 222E1, 225C7, 227C4, 229D1, 231C9 y 330F9 con respecto a las enzimas de referencia, se procede de la siguiente manera:

- preparación de un cultivo madre de *E. coli* que expresa una enzima recombinante de acuerdo con la invención durante la noche a 37 °C;
- inoculación de un medio de cultivo LB con 1 % de cultivo madre a 37 °C hasta que se obtiene una densidad óptica a 600 nm de 0,4;
- cultivo de dichas células a 20 °C durante 18 h;
- centrifugación durante 5 minutos a 7.900 rpm;
- resuspensión de los residuos celulares con tampón citrato fosfato 0,1 M a pH 5 que contiene 1 mg/ml de lisozima (DO₆₀₀ final 100);
- incubación de células resuspendidas durante 30 minutos en hielo;
- lisis de las células por tres ciclos de congelación/descongelación;

- fraccionamiento del ADN mediante sometimiento a ultrasonidos durante 3 segundos con una potencia de 5;
- centrifugación durante 30 minutos a 13.000 rpm;
- incubación de 100 µl de sobrenadante de rotura con 100 µl de tampón fosfato citrato 0,1 M a pH 5 que contiene 1 % de CMC durante 1 hora a 35 y 50 °C;
- 5 - eliminación de 100 µl de reacción;
- adición de 100 µ de reactivo DNS;
- incubación durante 5 minutos a 100 °C;
- incubación durante 3 minutos en hielo;
- centrifugación durante 10 minutos a 3.000 rpm;
- 10 - lectura de la densidad óptica a 540 nm en 150 µl.

De acuerdo con la invención, el cálculo de kcat se realiza de la siguiente manera:

- expresión de las DO a 540 nm en función de la cantidad de proteína de interés (en nM);
 - 15 - resta del valor del control negativo;
 - división por el coeficiente del intervalo patrón de glucosa (se revelan diferentes cantidades de glucosa con el DNS);
 - división por el tiempo de reacción.
- 20 La TABLA 2 presenta el valor de los kcat así como el factor de mejora con respecto a la proteína de referencia EG2 (SEQ ID NO: 2) obtenidos para los clones 37D12, 45A7, 46H1, 50E10, 108G5, 140E7, 146C4, 149E4, 173C6, 191H11, 222E1, 225C7, 227C4, 229D1, 231C9 y 330E9 en las condiciones experimentales del ensayo de actividad en CMC.

TABLA 2: Actividad endoglucanasa en CMC

	Clon	35°C		50°C	
		Kcat (min ⁻¹)	Factor de mejora	Kcat (min ⁻¹)	Factor de mejora
Clones de transposición en L	37D12	2717,1	2,27	5574,1	2,73
	45A7	3183,8	2,66	6500	3,18
	46H1	1933,1	1,61	3124,6	1,53
	50F10	2864,8	2,39	5284,6	2,59
	108G5	2062,2	1,72	4235,5	2,07
	140F7	2024	1,69	4079,6	2,00
	146C4	1692,3	1,41	3221,5	1,58
	149E4	3132,9	2,61	5316,8	2,60
	173C6	2472,9	2,06	6596,2	3,23
	191H11	3247,8	2,71	5275,3	2,58
	222E1	4484,5	3,74	9036,8	4,43
	225C7	2778,2	2,32	4026	1,97
	227C4	2340,3	1,95	3671,6	1,80
	229D1	2737,3	2,28	6597	3,23
	231C9	2344	1,95	3441,2	1,69
	330F9	2172,8	1,81	4222,8	2,07
Proteína de referencia	EG2	1199,05	1	2041,7	1

Los resultados muestran mejoras en la actividad enzimática significativas en comparación con la enzima de referencia EG2 (SEQ ID NO: 2) para estos clones.

30 2-2/Sobre el sustrato de celulosa hinchada con ácido fosfórico (PASC)

La mejora de la actividad de los clones 37D12, 45A7, 46H1, 50F10, 108G5, 140F7, 146C4, 149E4, 173C6, 191H11, 222E1, 225C7, 227C4, 229D1, 231C9 y 330F9 se confirmó en un segundo sustrato: celulosa hinchada con ácido fosfórico (PASC).

La TABLA 3 presenta el valor de los kcat así como los factores de mejora obtenidos para los clones 37D12, 45A7, 46H1, 50F10, 108G5, 140F7, 146C4, 149E4, 173C6, 191H11, 222E1, 225C7, 227C4, 229D1, 231C9 y 330F9 a 50 °C con respecto a la proteína de referencia EG2 (SEQ ID NO: 2) en las condiciones experimentales del ensayo de actividad en PASC.

TABLA 3: Actividad endoglucanasa en PASC

	Clon	50°C	
		Kcat (min ⁻¹)	Factor de mejora
Clones de transposición en L	37D12	4,51	1,12
	45A7	5,86	1,45
	46H1	6,56	1,62
	50F10	5,04	1,25
	108G5	8,49	2,10
	140F7	7,82	1,94
	146C4	8,12	2,01
	149E4	5,96	1,48
	173C6	5,87	1,45
	191H11	8,38	2,07
	222E1	5,14	1,27
	225C7	5,44	1,35
	227C4	4,76	1,18
	229D1	3,91	0,97
	231C9	4,62	1,14
	330F9	4,3	1,06
Proteína de referencia	EG2	4,04	1

Los resultados muestran mejoras en la actividad enzimática significativas con respecto a la enzima de referencia EG2 (SEQ ID NO: 2) para estos clones.

2-3/En el sustrato Sigmacell

La mejora de los clones 37D12, 45A7, 46H1, 50F10, 108G5, 140F7, 146C4, 149E4, 173C6, 191H11, 222E1, 225C7, 227C4, 229D1, 231C9 y 330F9 también se evaluó en un tercer sustrato: Sigmacell. El protocolo de ensayo es el mismo que el descrito anteriormente con el sustrato CMC. La incubación con el sustrato tiene lugar durante 24 h a 50 °C.

La TABLA 4 presenta el valor de los kcat así como los factores de mejora obtenidos para los clones 37D12, 45A7, 46H1, 50E10, 108G5, 140E7, 146C4, 149E4, 173C6, 191H11, 222E1, 225C7, 227C4, 229D1, 231C9 y 330E9 a 50 °C con respecto a la proteína de referencia EG2 (SEQ ID NO: 2) en las condiciones experimentales del ensayo de actividad en Sigmacell.

TABLA 4: Actividad endoglucanasa en Sigmacell

	Clon	50°C	
		Kcat (min ⁻¹)	Factor de mejora
Clones de transposición en L	37D12	6,84	1,20
	45A7	6,54	1,15
	46H1	6,04	1,06
	50F10	7,12	1,25
	108G5	5,95	1,05
	140F7	6,9	1,21
	146C4	9,3	1,63
	149E4	5,71	1,00
	173C6	5,85	1,03
	191H11	5,99	1,05
	222E1	9,16	1,61
	225C7	7,16	1,26
	227C4	7,22	1,27
	229D1	6,25	1,10
	231C9	6,46	1,14
	330F9	5,99	1,05
Proteína de referencia	EG2	5,69	1

Los resultados muestran que la mejora de actividad para los clones 37D12, 45A7, 46H1, 50E10, 108G5, 140E7, 146C4, 149E4, 173C6, 191H11, 222E1, 225C7, 227C4, 229D1, 231C9 y 330E9 es visible con respecto a la enzima de referencia EG2 (SEQ ID NO: 2) con el sustrato Sigmacell.

Ejemplo 2:

Las variantes 146C4, 191H11, 222E1 y 225C7, así como el gen de referencia EG2 de *T. reesei* (SEQ ID NO: 2) fueron clonados entre el promotor y el terminador *cbh1* en el plásmido pUT1040 que contiene un gen de resistencia a la fleomicina como marcador, utilizando una doble digestión con BamH1/XhoI. Se utilizaron 5 µg de cada vector para la transformación de la cepa *T. reesei* CL847AEG1. Los protoplastos se transformaron de acuerdo con un método convencional conocido por los expertos en la materia, mediante choque cálcico y PEG, con 5 µg de cada construcción. Los transformantes se seleccionaron en medio selectivo PDA/sacarosa que contenía 30 µg/l de fleomicina. Después de tres subcultivos sucesivos que permitieron obtener clones puros, se obtuvieron entre once y quince clones para cada una de las variantes. El conjunto de los clones se cultivó en medio F45 (800 µl de H₃PO₄ 85 %, 4,2 g (NH₄)₂SO₄, 0,3 g de MgSO₄·7H₂O, 0,75 g de maíz macerado, 1 ml de Oligo Ferment, 6 g de potasio ftalato, pH 5,8-6) con 5 g/l de glucosa y 10 g/l de sorbosa como sustrato de carbono e inductor. Después de 7 días de cultivo a 30 °C, se elimina el sobrenadante y se utiliza el equivalente de 10 mg/l de proteínas medidas por el método Lowry para un ensayo de actividad en carboximetilcelulosa.

Para las mediciones de actividad, se mezclaron 150 µl de una solución de CMC al 2 % en tampón citrato 50 mM, pH 4,8, con 150 µl de tampón citrato que contenía 10 mg/l de proteínas. La reacción se incubó a 50 °C y 35 °C durante 10 min y luego se inactiva al baño maría hirviendo. Después de la centrifugación durante 5 minutos, se eliminan 20 µl para realizar una determinación de azúcares reductores utilizando ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). La reducción de DNS y la formación de ácido 3-amino-5-nitrosalicílico se controlan mediante la lectura de absorción a 540 nm, y los azúcares reductores se cuantifican utilizando un intervalo de glucosa.

La TABLA 5 resume las actividades (expresadas en µmol equivalente glucosa/mg de proteína/min) obtenidas para los mejores clones para cada variante. El valor para la cepa ΔEG1 transformada con el gen EG2 nativo (ΔEG1cEG2) es una media de los cuatro mejores clones.

TABLA 5: Actividad endoglucanasa en CMC

clon	actividad específica a 50 °C (μmol/mg/min)	relación variante/AEG2cEG2 a 50 °C	actividad específica a 30 °C (μmol/mg/min)	relación variante/AEG2cEG2 a 35 °C
ΔEG2cEG2	10,8 ± 1,8		8,6 ± 2,2	
191H11/2	23,1 ± 1,8	2,1	9,9 ± 2,8	1,2
191H11/9	21,9 ± 4,0	2,0	10,8 ± 1,6	1,3
191H11/12	17,4 ± 0,4	1,6	9,7 ± 2,0	1,1
146C4/1	12,0 ± 1,1	1,1	8,5 ± 0,7	1,0
146C4/6	11,7 ± 0,4	1,1	8,6 ± 1,2	1,0
146C4/7	16,1 ± 1,1	1,5	11,9 ± 3,2	1,4
222E1/1	21,4 ± 0,8	2,0	13,9 ± 3,3	1,6
222E1/2	18,3 ± 1,3	1,7	13,7 ± 1,4	1,6
222E1/4	13,5 ± 0,6	1,3	10,4 ± 0,8	1,2
222E1/7	16,2 ± 1,3	1,5	11,4 ± 0,3	1,3
225C7/7	11,4 ± 0,1	1,1	10,3 ± 3,3	1,2
225C7/9	14,7 ± 0,4	1,4	8,1 ± 1,4	0,9

Para cada variante, al menos un clon posee una actividad de CMCase superior a la cepa ΔEG1cEG2 a 35 °C o a 50 °C, los mejores clones muestran dos veces más actividad que la cepa ΔEG1cEG2.

Ejemplo 3: Expresión recombinante de endoglucanasa de referencia EG2 y variantes 222E1 y 225C7 en *Saccharomyces cerevisiae*

1- Producción de la proteína de referencia endoglucanasa de referencia EG2 y su variante 222E1 en el medio extracelular

El gen de endoglucanasa de referencia EG2 de *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 1) y los genes de las variantes 222E1 y 225C7 (SEQ ID NO: 23 y 25, respectivamente) se clonaron sin su péptido señal en el vector pESC-LeuαAmc (CNRS-CERMAV). Esta construcción permite la expresión de las proteínas en el medio de cultivo de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* EBY100, auxótrofa para leucina y triptófano (Boder ET y Wittrup KD, Biotechnol Prog, 1998, 14: 55-62). Este plásmido permite colocar la expresión de genes bajo el control del promotor GAL1 inducible a galactosa, y posee el gen marcador de selección de la auxotrofia (Leu2) que permite la selección de transformantes.

La transformación de *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 se llevó a cabo de acuerdo con los métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia (transformación de levaduras por choque térmico y acetato de litio). Los transformantes se seleccionaron en medio YNB 0,67 %-Glc 2 %-Trp 0,01 %.

Se utilizó un transformante para cada gen (*Scα*-EG2, *Scα*-222E1 y *Scα*-225C7) para sembrar 15 ml de un medio mínimo YNB 0,67 %-Glc 2 %-SD-Trp 0,01 %. SD es una mezcla de aminoácidos (40 mg/l de adenina sulfato, 20 mg/l de L-arginina, 100 mg/l de ácido L-aspartico, 100 mg/l de ácido L-glutámico, 20 mg/l de L-histidina, 30 mg/l de L-lisina, 20 mg/l de L-metionina, 50 mg/l de L-fenilalanina, 375 mg/l de L-serina, 200 mg/l de L-treonina, 30 mg/l de L-tirosina, 150 mg/l de L-valina y 20 mg/l de uracilo). Después de 24 h de precultivo a 30 °C con agitación a 220 rpm, se inocularon las tres cepas *Scα*-EG2, *Scα*-222E1 y *Scα*-225C7 (DO₆₀₀ de 0,5) 150 ml de medio YNB 0,67 %-Gal 2 %-SD-Trp 0,01 %. Los cultivos se incubaron a 25 °C con agitación a 220 rpm. Después de 8 h de incubación, se añadieron 6 ml de citrato de sodio a pH 5,6 a cada cultivo para estabilizar el pH a 5.

Después de 4 días de incubación, se eliminaron 20 ml de cultivo. El sobrenadante del cultivo se obtuvo después de la centrifugación a 3.000 g a 4 °C durante 5 minutos.

2- Determinación de la actividad endoglucanasa en *p*-nitrofenil-β-celotriosida

La actividad endoglucanasa de los sobrenadantes de cultivo se midió por hidrólisis del sustrato pNPC3 en un volumen de 450 μl en las siguientes condiciones:

- 50 mM de tampón de citrato a pH 5
- 2 mM de pNPC3
- 56,3 μl del sobrenadante de cultivo de las cepas *Scα*-EG2, *Scα*-221E1 y *Scα*-225C7
- incubación a 35 °C durante 6 h.

La reacción se detuvo mediante la adición de 100 μl de carbonato de sodio 1 M a 100 μl de reacción de hidrólisis. La concentración de para-nitrofenol (pNP) liberada por hidrólisis de pNPC3 se determinó midiendo la absorbancia a 415 nm en comparación con un intervalo patrón de para-nitrofenol (lineal de 0,36 μM a 360 μM).

Los resultados de la FIGURA 1 muestran que la cepa Sca-222E1 posee una actividad endoglucanasa mejorada con un factor 1,6 en comparación con la cepa Sca-EG2 que expresa la enzima de referencia EG2 (SEQ ID NO: 2). La cepa Sca-225C7 demuestra, por su parte, menos eficacia para la hidrólisis de este sustrato.

5 **3- Determinación de la actividad endoglucanasa en carboximetilcelulosa**

La actividad endoglucanasa de los sobrenadantes de cultivo se midió por hidrólisis de carboximetilcelulosa (CMC) en un volumen de 700 µl en las siguientes condiciones:

- 10 - 50 mM de tampón citrato a pH 5
- 1 % de CMC
- 210 µl de sobrenadante de cultivo de cepas Sca-EG2, Sca-222E1 y Sca-225C7 dializadas contra el tampón citrato 50 mM pH 5 en membrana de 10 kDa y concentrados dos veces
- incubación a 35 °C durante 24 h.

15 La reacción se detuvo mediante la adición de 150 µl de reactivo DNS a 100 µl de reacción de hidrólisis. Después de un calentamiento durante 5 minutos a 100 °C y enfriamiento en hielo, la cantidad de azúcares reductores liberados se determinó midiendo la absorbancia a 550 nm en comparación con un intervalo patrón preparado con glucosa.

- 20 Los resultados de la FIGURA 2 indican que la cantidad de azúcares reductores liberados por la acción de las variantes de las cepas Sca-222E1 y Sca-225C7 es mayor que con la cepa Sca-EG2. Por lo tanto, después de 1 h de hidrólisis de la CMC, el factor de mejora a 35 °C en este sustrato es de 3,5 para Sca-222E1 y 2,6 para Sca-225C7 con respecto a Sca-EG2. Más allá de este tiempo de incubación, la CMC continúa hidrolizándose por las dos variantes mientras que la velocidad de reacción se vuelve prácticamente cero en presencia de la proteína de
- 25 referencia EG2 (SEQ ID NO: 2).

Ejemplo 4: Producción de enzimas por *T. reesei* en matraces alimentados

- 30 Las cepas de referencia y las que presentan la mejor actividad en CMC (CL847, AEG1, ΔEG1cEG2, 146C4/7, 191H11/9, 222E1/1, 222E1/2, 222E1/7, 225C7/7) se cultivaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml. 55 ml de medio F45 (10 g/l de tampón dipotasio ftalato pH 6, 4,2 g/l (NH₄)₂SO₄, 300 mg/l de MgSO₄·7H₂O, 150 mg/l de CaCl₂·2H₂O, 1,5 g/l de maceración del maíz, 0,07 % de ácido ortofosfórico, 5 mg/l de FeSO₄, 1,4 mg/l de MnSO₄, 1,4 mg/l de ZnSO₄, 3,7 mg/l de CoCl₂ y 12,5 g/l de glucosa) se siembran y agitan a 150 rpm y 30 °C. La producción se realiza en dos fases: una fase continua en glucosa y una fase discontinua en lactosa. Los muestreos regulares permiten
- 35 determinar el momento en el que la concentración de glucosa cae por debajo de 3 g/l. En este estadio, se inicia un suministro semicontinuo con una bomba de jeringa (6 vías). Los cultivos se suministran con una solución de 50 g/l de lactosa y 0,3 % de NH₃ a un caudal de 40 mg de azúcar/g de biomasa por hora. Se toman muestras diarias para determinar el pH, el peso en seco y la concentración de proteínas en el sobrenadante. Después de 5 días de cultivo semicontinuo, el cultivo se filtra a través de un filtro de 0,45 µm y el sobrenadante se congela.

40 La concentración final de proteínas se encontraba en el orden de 3 a 4 g/l. Si la concentración era inferior a 3 g/l, los sobrenadantes se concentraron en una columna (Vivaspin MWC05, Sartorius).

Ejemplo 5: Eficacia de las enzimas resultantes de la transposición en L en la hidrólisis de la biomasa lignocelulósica de acuerdo con un procedimiento HFS

45 El sustrato de referencia utilizado es una paja de trigo que se ha sometido a un pretratamiento por explosión de vapor (19 bar - 3 minutos) después de la impregnación ácida al 0,01 % de H₂SO₄ durante 10 horas, que se ha lavado, neutralizado a pH 5, prensado, secado. Sus características se presentan en la Tabla 9.

50 **Tabla 6: Composición de la paja utilizada para el ensayo de hidrólisis**

Composición	% m/m
SIA	97,52
Contenido en cenizas	5
Celulosa	51,7
Xilanos corregidos	3,57
Hemicelulosa	4,14
Lignina de Klason (sobreestimada)	36,49
Acetil	0,6

Las hidrólisis se llevaron a cabo al 10 % de materia seca m/m, o en un equivalente al 5,4 % de celulosa m/m.

55 La tasa de proteínas se fija a 10 mg/g de materia seca o aproximadamente 19 mg/g de celulosa. La concentración de cócteles enzimáticos se midió por el método Lowry utilizando ASB como referencia. Cada cóctel se suplementó con actividad β-glucosidasa con un máximo de 120 ± 2 IU/g de celulosa, añadiendo β-glucosidasa SP188 (Novozymes).

Los ensayos se llevan a cabo en tubos Eppendorf de 2 ml útiles (1g de reacción) que contienen:

- 0,11 ± 0,001 g de sustrato de paja lavada

5 - 0,9 ± 0,02 ml de medio de reacción de hidrólisis compuesto de tampón acetato 50 mM - pH 4,8 y cloranfenicol (0,05 g/l)

- entre 0,1 y 0,2 ± 0,02 g de cóctel enzimático en función de su tasa de proteínas.

10 Las hidrólisis enzimáticas se llevan a cabo a 45 ± 2 °C bajo agitación tipo vórtex a 900 rotaciones por minuto en un *Thermomixer Comfort Eppendorf*.

Todos los ensayos se llevan a cabo por duplicado con tiempos de muestreo fijados a t 24, 48 y 96 horas, algunos de los cuales se muestrean a t 72 horas.

15 En cada tiempo de muestreo, los hidrolizados se escaldan durante 5 minutos en los tubos Eppendorf sacrificados. Estos tubos se enfrían y centrifugan. La determinación de glucosa se realiza por HPLC. Paralelamente, los residuos sólidos de cada tubo Eppendorf se lavan y se centrifugan 3 veces antes de secarse a 105 °C durante 24 horas para evaluar los SIA (sólidos insolubles en agua). El cálculo del rendimiento de la hidrólisis se realiza teniendo en cuenta los SIA.

20 Los cócteles resultantes del ejemplo 4 fueron evaluados. Se llevan a cabo dos ensayos de control con cócteles de referencia también suplementados con β-glucosidasa para comparación: un cóctel producido por la cepa CL847 AEG1 (ΔEG1) y un cóctel producido por la cepa CL847 ΔEG1 retransformada con el gen de referencia EG2 (ΔEG1cEG2).

La FIGURA 3 presenta los resultados de HFS para el cóctel resultante de la cepa 146C4/7 (SEQ ID NO: 16).

30 Los resultados presentados en la FIGURA 3 muestran que la velocidad inicial de hidrólisis del cóctel producido por la variante 146C4 es superior a la de los cócteles de referencia ΔEG1 y AEG1cEG2. El rendimiento final de la hidrólisis también es superior al de los cócteles de referencia ΔEG1 y AEG1cEG2.

35 La FIGURA 4 presenta los resultados de HFS para el cóctel resultante de la cepa 222E1/1 (SEQ ID NO: 24) y el cóctel resultante de la cepa 225C7/7 (SEQ ID NO: 26).

40 Los resultados presentados en la FIGURA 4 muestran que las velocidades iniciales de hidrólisis de los cócteles producidos por la variante 222E1 y la variante 225C7 son superiores a las de los cócteles de referencia ΔEG1 y AEG1cEG2. Los rendimientos finales de hidrólisis también son superiores a los de los cócteles de referencia ΔEG1 y AEG1cEG2.

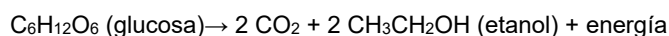
Ejemplo 6: Eficacia de las enzimas en la hidrólisis de biomasa lignocelulósica de acuerdo con un procedimiento SFS

El sustrato utilizado es el mismo que el descrito en la TABLA 6 (Ejemplo 4).

Las SFS se realizan por triplicado en reactores de laboratorio. Se constituyen de los siguientes elementos:

- un frasco de vidrio de 30 ml de volumen útil;
- un tapón de seguridad de poliéter éter cetona (Peek);
- una válvula unidireccional DV-118 comercializada por la sociedad Vaplock fijada a través del tapón. La válvula está configurada para abrirse cuando la presión relativa en la botella es superior a 70 mbar;
- un tubo hueco de polipropileno, unido a través de un segundo que atraviesa el tapón y equipado en el extremo inferior de dicho tubo con un septo;
- una junta plana dispuesta entre el cuello del frasco y el tapón.

El principio de implementación de los biorreactores es el siguiente: el CO₂ producido durante la fermentación etanólica se acumula en el cielo sobre el medio de reacción que causa por acumulación un aumento en la presión en el biorreactor (P_G). Cuando P_G es superior a la presión de apertura de la válvula unidireccional (P_S), ésta se abre para liberar una cantidad de gas que por ejemplo se determina mediante pesaje. Cuando P_G < P_S, la válvula se cierra hasta que P_G sea superior a P_S. Por lo tanto, el biorreactor en funcionamiento todavía está bajo presión para proporcionar un medio anaeróbico estable para la fermentación. La cantidad de etanol producida se evalúa por la producción de CO₂ estimada por la pérdida de peso a partir de la siguiente ecuación estequiométrica de fermentación de glucosa en etanol:



El medio de cultivo utilizado para SFS es un medio acuoso que comprende:

- un tampón acetato 50 mM para pH 5;
- cloranfenicol a 0,1 g/l;
- medio nutritivo con 3 g/l de KH_2PO_4 , 2 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,4 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 1 g/l de extracto de levadura.

Las SFS se prepararon con $10 \pm 0,01$ % m/m de materia seca o un equivalente de 5,4 % de celulosa m/m para una masa de reacción total de $15 \pm 0,003$ g. La tasa de proteínas se fija en $10 \pm 0,01$ mg de celulasas por gramo de materia seca, o aproximadamente 19 mg/g de celulosa. La concentración de cócteles enzimáticos se midió por el método de Lowry utilizando ASB (albúmina sérica bovina) como referencia. Cada cóctel se suplementó con actividad de β -glucosidasa a un máximo de 120 ± 2 IU/g de celulosa, añadiendo β -glucosidasa SP188 (Novozymes).

La levadura de fermentación de azúcares (*Saccharomyces cerevisiae*, cepa de etanol rojo, Fermentis, Francia) se añade al medio para obtener un contenido de $2 \pm 0,1$ g/kg.

Se añaden enzimas y levaduras a los biorreactores después de una hora de acondicionamiento de la paja de trigo pretratada a 35 °C con el tampón, cloranfenicol y medio de cultivo.

La reacción de SFS se realiza a una temperatura de aproximadamente 35 °C, colocando el biorreactor de laboratorio en una incubadora tipo INFORS Multitron HT Standard con una velocidad de rotación orbital de 150 rpm.

Con el tiempo, la pérdida de masa se controló mediante el pesaje de los biorreactores. Al final de la reacción, el mosto de fermentación se calienta a 100 °C durante 5 minutos, se enfría y se centrifuga para separar las materias sólidas no hidrolizadas del zumo de fermentación. Este último se analiza luego por cromatografía en fase gaseosa para determinar su concentración de etanol.

Se evaluaron los cócteles del ejemplo 4. Dos ensayos de control se llevan a cabo con cócteles de referencia también suplementados con β -glucosidasa para la comparación: un producto con la cepa CL847 AEG1 (ΔEG1) y uno con la cepa CL847 AEG1 retransformada con el gen de referencia EG2 ($\Delta\text{EG1cEG2}$).

La FIGURA 5 presenta los resultados de SFS para el cóctel resultante de la cepa 146C4/7 y para el cóctel resultante de la cepa 191H11/9 (SEQ ID NO 22):

Los resultados presentados en la FIGURA 5 muestran que los progresos (producciones de etanol para la misma dosis de enzimas) de SFS en 100 horas para el cóctel que expresa endoglucanasa 146C4 y el cóctel que expresa endoglucanasa 191H11 son superiores a los de los cócteles de referencia ΔEG1 y $\Delta\text{EG1cEG2}$.

La FIGURA 6 presenta los resultados de SFS para los 3 cócteles resultantes de las cepas 222E1/1, 222E1/2 y 222E1/7 (media de los resultados obtenidos con las 2 variantes) y para el cóctel resultante de la cepa 225C7/7.

Los resultados presentados en la FIGURA 6 muestran que los progresos de SFS en 100 horas para el cóctel que expresa la endoglucanasa 222E1 y el cóctel que expresa la endoglucanasa 225C7 son equivalentes y superiores a los de los cócteles de referencia ΔEG1 y $\Delta\text{EG1cEG2}$.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> IFPEN

<120> VARIANTES DE LA ENDOGLUCANASA CON ACTIVIDAD MEJORADA Y SUS USOS

<130> BFF130

<160> 38

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1257

<212> ADN

<213> *Trichoderma reesei*

<400> 1

atgaacaagt ccgtgggtcc attgctgctt gcagcgtcca tactatatgg cggcgccgct	60
gcacagcaga ctgtctgggg ccagtgtgga ggtattggtt ggagcggacc tacgaattgt	120
gctcctggct cagcttggtc gacctcaat ccttattatg cgcaatgtat tcggggagcc	180
actactatca ccacttcgac ccggccacca tccgggtccaa ccaccaccac cagggctacc	240
tcaacaagct catcaactcc acccagcagc tctgggggtcc gatttgccgg cgtaaacatc	300
gcgggttttg actttggctg taccacagat ggcacttgcg ttacctcgaa ggtttatcct	360
ccgttgaaag acttcaocgg ctcaaacaac taocccgatg gcacggcca gatgcagcac	420
ttcgtcaacg acgacgggat gactattttc cgttacctg tcggatggca gtacctcgtc	480
aacaacaatt tggggggcaa tcttgattcc acgagcattt ccaagtatga tcagcttggt	540
caggggtgcc tgtctctggg cgcatactgc atcgtcgaca tccacaatta tgctcgatgg	600
aacgggtgga tcattggtca gggcgccct actaatgctc aattcacgag cctttggctg	660
cagttggcat caaagtacgc atctcagtcg aggggtggtt tcggcatcat gaatgagccc	720
cacgacgtga acatcaacac ctgggctgcc acggtccaag aggttgtaac cgcaatccgc	780
aacgctggtg ctacgtcgca attcatctct ttgcctggaa atgattggca atctgctggg	840
gctttcatat ccgatggcag tgcagccgcc ctgtctcaag tcacgaacco ggatgggtca	900
acaacgaatc tgatttttga cgtgcacaaa tacttggtact cagacaactc cgtactcac	960
gccgaatgta ctacaaataa cattgacggc gccttttctc cgcttgccac ttggctccga	1020
cagaacaatc gccaggctat cctgacagaa accgggtggtg gcaacgttca gtccctgcata	1080
caagacatgt gccagcaaat ccaatatctc aaccagaact cagatgtcta tcttggtat	1140
gttggttggg gtgccggatc atttgatagc acgtatgtcc tgacggaaac accgactggc	1200
agtggtaact catggaocga cacatccttg gtcagctcgt gtctagcaag aaagtag	1257

<210> 2
 <211> 418
 <212> PRT
 <213> *Trichoderma reesei*
 <400> 2

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

225		230		235		240
His Asp Val Asn Ile Asn Thr Trp Ala Ala Thr Val Gln Glu Val Val						
	245		250		255	
Thr Ala Ile Arg Asn Ala Gly Ala Thr Ser Gln Phe Ile Ser Leu Pro						
	260		265		270	
Gly Asn Asp Trp Gln Ser Ala Gly Ala Phe Ile Ser Asp Gly Ser Ala						
	275		280		285	
Ala Ala Leu Ser Gln Val Thr Asn Pro Asp Gly Ser Thr Thr Asn Leu						
	290		295		300	
Ile Phe Asp Val His Lys Tyr Leu Asp Ser Asp Asn Ser Gly Thr His						
305		310		315		320
Ala Glu Cys Thr Thr Asn Asn Ile Asp Gly Ala Phe Ser Pro Leu Ala						
	325		330		335	
Thr Trp Leu Arg Gln Asn Asn Arg Gln Ala Ile Leu Thr Glu Thr Gly						
	340		345		350	
Gly Gly Asn Val Gln Ser Cys Ile Gln Asp Met Cys Gln Gln Ile Gln						
	355		360		365	
Tyr Leu Asn Gln Asn Ser Asp Val Tyr Leu Gly Tyr Val Gly Trp Gly						
	370		375		380	
Ala Gly Ser Phe Asp Ser Thr Tyr Val Leu Thr Glu Thr Pro Thr Gly						
385		390		395		400
Ser Gly Asn Ser Trp Thr Asp Thr Ser Leu Val Ser Ser Cys Leu Ala						
	405		410		415	
Arg Lys						

<210> 3
 <211> 1257
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> 37D12

 <400> 3

atgaacaagt ccgtaggctcc attgctgctt gcagcgtcca tactatatgg cggcgccgct	60
gcacagcaga ctgtctgggg ccagtgtgga ggtattgggt ggagcggacc tacgaattgt	120
gctcctggct cagcttggtc gaccctcaat ccttattatg cgcaatgtat tccgggagcc	180
actactatca ccacttcgac ccggccacca tccggtccaa ccaccaccac cagggtacc	240
tcaacaagct catcaactcc acccacgagc tctggggctc gatttgccgg cgtaacatc	300
gcgggttttg actttggctg taccacagat ggcacttgcg ttacctcgaa ggtttatcct	360
ccgttgaaga acttcaccgg ctcaaacaac taccocgatg gcacggcca gatgcagcac	420
ttcgtcaacg acgacgggat gactattttc cgcttaoctg tcggatggca gtacctgctc	480
aacaacaatt tgggcggcaa tcttgattcc acgagcattt ccaagtatga tcagcttggt	540
caggggtgcc tgtctctggg cgcatactgc atcgtcgaca tccacaatta tgctcgatgg	600
aacggtggga tcattggtca gggcgccct actaatgctc aattcacgag cctttggtcg	660
cagttggcat caaagtacgc atctcagtcg aggggtgtgt tcggcatcat gaatgagccc	720
cacgacgtga acatcaacac ctgggctgcc acggtccaag aggttgtaac cgcaatccgc	780
aacgctggtg ctacgtcgca attcatctct ttgcctggaa atgattggca atctgctggg	840
gctttcatat ccgatggcag tgcagcogcc ctgtctcaag tcacgaaccc ggatgggtca	900
acaacgaatc tgatttttga cgtgcacaaa tacttggtact cagacaactc cgggtactcac	960
gccgaatgtg taacaaataa cattgaogcc gcctttgcac cgcttgccac ttggctccga	1020
gcaaacggtc gccaggctat cctgagcgaa accggtggtg gcaacacogc gtocctgccag	1080
acatatttgt gccagcaagt tgcttatctc aacgcaaact cagatgtota tcttggctat	1140
attggttggc ctgccggatc atttgatagc acgtatatcc tgacggaaac accgaatggc	1200
agtggtaact catggacgga cacatccttg gtcagctcgt gtctagcaag aaagtag	1257

<210> 4
 <211> 418
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> 37D12

<400> 4

ES 2 682 520 T3

Met Asn Lys Ser Val Ala Pro Leu Leu Leu Ala Ala Ser Ile Leu Tyr
1 5 10 15

Gly Gly Ala Ala Ala Gln Gln Thr Val Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile
20 25 30

Gly Trp Ser Gly Pro Thr Asn Cys Ala Pro Gly Ser Ala Cys Ser Thr
35 40 45

Leu Asn Pro Tyr Tyr Ala Gln Cys Ile Pro Gly Ala Thr Thr Ile Thr

ES 2 682 520 T3

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

Ile Phe Asp Val His Lys Tyr Leu Asp Ser Asp Asn Ser Gly Thr His
305 310 315 320

Ala Glu Cys Val Thr Asn Asn Ile Asp Ala Ala Phe Ala Pro Leu Ala
325 330 335

Thr Trp Leu Arg Ala Asn Gly Arg Gln Ala Ile Leu Ser Glu Thr Gly
340 345 350

Gly Gly Asn Thr Ala Ser Cys Gln Thr Tyr Leu Cys Gln Gln Val Ala
355 360 365

Tyr Leu Asn Ala Asn Ser Asp Val Tyr Leu Gly Tyr Ile Gly Trp Ser
370 375 380

Ala Gly Ser Phe Asp Ser Thr Tyr Ile Leu Thr Glu Thr Pro Asn Gly
385 390 395 400

Ser Gly Asn Ser Trp Thr Asp Thr Ser Leu Val Ser Ser Cys Leu Ala
405 410 415

Arg Lys

<210> 5
<211> 1260
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 45A7

<400> 5

atgaacaagt ccgtggctcc attgctgctt gcagcgtcca tactatatgg cggcgccgct	60
gcacagcaga ctgtctgggg ccagtgtgga ggtattggtt ggagcggacc tacgaattgt	120
gctoctggct cagcttgctt gaccctcaat ccttattatg cgcaatgtat tccgggagcc	180
actactatca ccacttogac cgggccaoca tcoggtocaa ccaccaccac cagggctacc	240
tcaacaagct catcaactcc acccacgagc tctggggctc gatttgccgg cgtaaacatc	300
gcggggtttt actttggctg taccacagat ggcacttgcg ttacctogaa ggtttatcct	360
ccgttgaaga acttcaccgg ctcaaacaac taccocgatg gcacggcca gatgcagcac	420
ttcgtcaacg acgacgggat gactattttc cgcttacctg tcggatggca gtacctogtc	480
aacaacaatt tgggcggcaa tottgattcc acgagcattt ccaagtatga tcagcttggt	540
caggggtgcc tgtctctggg cgcatactgc atcgtcgaca tcacacaatta tgctcgatgg	600
aacgggtggga tcattggtca gggcgccctt actaatgctc aattcacgag cctttggtcg	660
cagttggcat caaagtacgc atctcagtcg aggggtgtgtt tcggcatcat gaatgagccc	720
cacgacgtga acatcaacac ctgggctgcc acgggtccaag aggttgtaac cgcaatccgc	780
aacgctggtg ctacgtcgca attcatctct ttgcctggaa atgattggca atctgctggg	840
gctttcatat ccgatggcag tgcagccgcc ctgtctcaag tcacgaacct ggatgggtca	900
acaacgaatc tgatttttga cgtgcacaaa tacttggact cagacaactc cggtaactac	960
gccgaatgtg taacaaataa cattgacgcc gcctttgcac cgcttgccac ttggctccga	1020
gcaaacggac gccaggctat cctgacagaa accgggtggtg gcaacacgcg gtcctgccag	1080
acatatttgt gccagcaagt tgcttatctc aaogcaaaact cagatgtcta tcttggctat	1140
attggttggt ctgccggatc atttgatagc acgtatattc tgacggaaac accgaatggc	1200
agtggttctt caatgacgga ccaagcgttg gtcgcggctt gtctaactag aacatcgtag	1260

<210> 6
 <211> 419
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> 45A7

<400> 6

ES 2 682 520 T3

Met	Asn	Lys	Ser	Val	Ala	Pro	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Ser	Ile	Leu	Tyr
1				5					10					15	
Gly	Gly	Ala	Ala	Ala	Gln	Gln	Thr	Val	Trp	Gly	Gln	Cys	Gly	Gly	Ile
			20					25					30		
Gly	Trp	Ser	Gly	Pro	Thr	Asn	Cys	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	Cys	Ser	Thr
		35					40					45			
Leu	Asn	Pro	Tyr	Tyr	Ala	Gln	Cys	Ile	Pro	Gly	Ala	Thr	Thr	Ile	Thr
	50					55					60				
Thr	Ser	Thr	Arg	Pro	Pro	Ser	Gly	Pro	Thr	Thr	Thr	Thr	Arg	Ala	Thr
65					70					75					80
Ser	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Pro	Pro	Thr	Ser	Ser	Gly	Val	Arg	Phe	Ala
				85					90					95	
Gly	Val	Asn	Ile	Ala	Gly	Phe	Asp	Phe	Gly	Cys	Thr	Thr	Asp	Gly	Thr
			100					105					110		
Cys	Val	Thr	Ser	Lys	Val	Tyr	Pro	Pro	Leu	Lys	Asn	Phe	Thr	Gly	Ser
		115					120					125			

Asn Asn Tyr Pro Asp Gly Ile Gly Gln Met Gln His Phe Val Asn Asp
 130 135 140

Asp Gly Met Thr Ile Phe Arg Leu Pro Val Gly Trp Gln Tyr Leu Val
 145 150 155 160

Asn Asn Asn Leu Gly Gly Asn Leu Asp Ser Thr Ser Ile Ser Lys Tyr
 165 170 175

Asp Gln Leu Val Gln Gly Cys Leu Ser Leu Gly Ala Tyr Cys Ile Val
 180 185 190

Asp Ile His Asn Tyr Ala Arg Trp Asn Gly Gly Ile Ile Gly Gln Gly
 195 200 205

Gly Pro Thr Asn Ala Gln Phe Thr Ser Leu Trp Ser Gln Leu Ala Ser
 210 215 220

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

His Asp Val Asn Ile Asn Thr Trp Ala Ala Thr Val Gln Glu Val Val
 245 250 255

Thr Ala Ile Arg Asn Ala Gly Ala Thr Ser Gln Phe Ile Ser Leu Pro
 260 265 270

Gly Asn Asp Trp Gln Ser Ala Gly Ala Phe Ile Ser Asp Gly Ser Ala
 275 280 285

Ala Ala Leu Ser Gln Val Thr Asn Pro Asp Gly Ser Thr Thr Asn Leu
 290 295 300

Ile Phe Asp Val His Lys Tyr Leu Asp Ser Asp Asn Ser Gly Thr His
 305 310 315 320

Ala Glu Cys Val Thr Asn Asn Ile Asp Ala Ala Phe Ala Pro Leu Ala
 325 330 335

Thr Trp Leu Arg Ala Asn Gly Arg Gln Ala Ile Leu Thr Glu Thr Gly
 340 345 350

Gly Gly Asn Thr Ala Ser Cys Gln Thr Tyr Leu Cys Gln Gln Val Ala
 355 360 365

Tyr Leu Asn Ala Asn Ser Asp Val Tyr Leu Gly Tyr Ile Gly Trp Ser
 370 375 380

ES 2 682 520 T3

Ala Gly Ser Phe Asp Ser Thr Tyr Ile Leu Thr Glu Thr Pro Asn Gly
385 390 395 400

Ser Gly Ser Ser Met Thr Asp Gln Ala Leu Val Ala Ala Cys Leu Thr
405 410 415

Arg Thr Ser

<210> 7
<211> 1257
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 46H1

<400> 7

atgaacaagt	cogtggetcc	attgctgctt	gcagcgtcca	tactatatgg	cggcgccgct	60
gcacagcaga	ctgtctgggg	ccagtgtgga	ggtattggtt	ggagcggacc	tacgaattgt	120
gctcctggct	cagcttggtc	gacctcaat	ccttattatg	cgcaatgtat	tccgggagcc	180
actactatca	ccacttogac	cgggccacca	tcoggtocaa	ccaccaccac	cagggctacc	240
tcaacaagct	catcaactcc	acccacgagc	tctgggggtcc	gatttgccgg	cgtaaacatc	300
gcgggttttg	actttggctg	taccacagat	ggcacttgcg	ttacctcgaa	ggtttatcct	360
ccgttgaaga	acttcacogg	ctcaaacaac	taccccgatg	gcacggcca	gatgcagcac	420
ttcgtcaacg	acgacgggat	gactattttc	cgcttacctg	tcggatggca	gtacctcgtc	480
aacaacaatt	tggggggcaa	tcttgattcc	acgagcattt	ccaagtatga	tcagcttggt	540
caggggtgcc	tgtctctggg	cgcatactgc	atcgctcgaca	tcacacaatta	tgctcgatgg	600
aacggtggga	tcattggtca	ggcgggccct	actaatgctc	aattcacgag	cctttggtcg	660
cagttggcat	caaagtacgc	atctcagtcg	agggtgtggt	tcggcatcat	gaatgagccc	720
cacgacgtga	acatcaacac	ctgggctgcc	acggtccaag	aggttgtaac	cgcaatccgc	780
aacgctgggtg	ctacgtcgca	attcatctct	ttgcctggaa	atgattggca	atctgctggg	840
gctttcataa	ccgatggcag	tgacgcccgc	ctgtctcaag	tcacgaaccc	ggatgggtca	900
acaacgaatc	tgatttttga	cgtgcacaaa	tacttggaact	cagacaactc	cgttactcac	960
gccgaatgtg	tgacaaataa	cattgacacc	gcctttgcac	cgcttgccac	ttggctccga	1020
cagaacaatc	gccaggctat	cctgacagaa	accggtgggtg	gcaacgttca	gtcctgcata	1080
caagacatgt	gccagcaaat	ccaatatctc	aaccagaact	cagatgtcta	tcttggttat	1140
gttggttggg	gtgccggatc	atttgatagc	acgtatgtcc	tgacggaaac	accgactggc	1200
agtggtaact	catggacgga	cacatccttg	gtcagctcgt	gtctagcaag	aaagtag	1257

<210> 8

<211> 418
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> 46H1

<400> 8

```

Met Asn Lys Ser Val Ala Pro Leu Leu Leu Ala Ala Ser Ile Leu Tyr
1      5      10      15

Gly Gly Ala Ala Ala Gln Gln Thr Val Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile
      20      25      30

Gly Trp Ser Gly Pro Thr Asn Cys Ala Pro Gly Ser Ala Cys Ser Thr
      35      40      45

Leu Asn Pro Tyr Tyr Ala Gln Cys Ile Pro Gly Ala Thr Thr Ile Thr
      50      55      60

Thr Ser Thr Arg Pro Pro Ser Gly Pro Thr Thr Thr Thr Arg Ala Thr
65      70      75      80

Ser Thr Ser Ser Ser Thr Pro Pro Thr Ser Ser Gly Val Arg Phe Ala
      85      90      95

Gly Val Asn Ile Ala Gly Phe Asp Phe Gly Cys Thr Thr Asp Gly Thr
      100      105      110

Cys Val Thr Ser Lys Val Tyr Pro Pro Leu Lys Asn Phe Thr Gly Ser
      115      120      125

Asn Asn Tyr Pro Asp Gly Ile Gly Gln Met Gln His Phe Val Asn Asp
      130      135      140

Asp Gly Met Thr Ile Phe Arg Leu Pro Val Gly Trp Gln Tyr Leu Val
145      150      155      160

Asn Asn Asn Leu Gly Gly Asn Leu Asp Ser Thr Ser Ile Ser Lys Tyr
      165      170      175

Asp Gln Leu Val Gln Gly Cys Leu Ser Leu Gly Ala Tyr Cys Ile Val
      180      185      190

Asp Ile His Asn Tyr Ala Arg Trp Asn Gly Gly Ile Ile Gly Gln Gly
      195      200      205

```

Gly Pro Thr Asn Ala Gln Phe Thr Ser Leu Trp Ser Gln Leu Ala Ser
 210 215 220

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

His Asp Val Asn Ile Asn Thr Trp Ala Ala Thr Val Gln Glu Val Val
 245 250 255

Thr Ala Ile Arg Asn Ala Gly Ala Thr Ser Gln Phe Ile Ser Leu Pro
 260 265 270

Gly Asn Asp Trp Gln Ser Ala Gly Ala Phe Ile Thr Asp Gly Ser Ala
 275 280 285

Ala Ala Leu Ser Gln Val Thr Asn Pro Asp Gly Ser Thr Thr Asn Leu
 290 295 300

Ile Phe Asp Val His Lys Tyr Leu Asp Ser Asp Asn Ser Gly Thr His
 305 310 315 320

Ala Glu Cys Val Thr Asn Asn Ile Asp Thr Ala Phe Ala Pro Leu Ala
 325 330 335

Thr Trp Leu Arg Gln Asn Asn Arg Gln Ala Ile Leu Thr Glu Thr Gly
 340 345 350

Gly Gly Asn Val Gln Ser Cys Ile Gln Asp Met Cys Gln Gln Ile Gln
 355 360 365

Tyr Leu Asn Gln Asn Ser Asp Val Tyr Leu Gly Tyr Val Gly Trp Gly
 370 375 380

Ala Gly Ser Phe Asp Ser Thr Tyr Val Leu Thr Glu Thr Pro Thr Gly
 385 390 395 400

Ser Gly Asn Ser Trp Thr Asp Thr Ser Leu Val Ser Ser Cys Leu Ala
 405 410 415

Arg Lys

<210> 9
 <211> 1257
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> 50F10

ES 2 682 520 T3

<400> 9

```

atgaacaagt ccgtggctcc attgctgctt gcagcgtcca tactatatgg cggcgccgct      60
gcacagcaga ctgtctgggg ccagtgtgga ggtattgggt ggagcggacc tacgaattgt      120
gctcctgggt cagcttgctt gaccctcaat ccttattatg cgcaatgtat tccgggagcc      180
actactatca ccacttcgac ccggccacca tccggtccaa ccaccaccac cagggctacc      240
tcaacaagct catcaactcc accacagagc tctggggctc gatttgccgg cgttaacatc      300
gggggttttg actttggctg taccacagat ggcacttgcg ttacctcgaa ggtttatcct      360
ccgttgaaga acttcaccgg ctcaaacaac taccocgatg gcacggcca gatgcagcac      420
ttcgtcaacg acgacgggat gactattttc cgttaacctg tcggatggca gtacctcgtc      480
aacaacaatt tgggcggcaa tcttgattcc acgagcattt ccaagtatga tcagcttggt      540
caggggtgcc tgtctctggg cgcatactgc atcgtcgaca tccacaatta tgctcgatgg      600
aacggtggga tcattggtca gggcgccctt actaatgctc aattcacgag cctttggtcg      660
cagttggcat caaagtacgc atctcagtcg aggggtgtgt tcggcatcat gaatgagccc      720
cacgacgtga acatcaacac ctgggctgcc acggtccaag aggttgtaac cgcaatccgc      780
aacgctggtg ctacgtcgca attcatctct ttgcctggaa atgattggca atctgctggg      840
gctttcatat ccgatggcag tgcagccgcc ctgtctcaag tcacgaacct ggatgggtca      900
acaacgaatc tgatttttga cgtgcacaaa tacttggaact cagacaactc cggtaactcac      960
gcogaatgta ctacaaataa cattgaacgc gccttttctc cgcttgccac ttggctccga     1020
cagaacaatc gccaggctat cctgacagaa accggtggtg gcaacgttca gtccctgccag     1080
acatatttgt gccagcaagt tgcttatctc aacgcaaact cagatgtcta tcttggtat      1140
attggttggt ctgccgatc atttgatagc acgtatgtcc tgacggaaac accgactggc     1200
agtggtaact catggacgga cacatccttg gtcagctcgt gtctagcaag aaagtag      1257

```

5 <210> 10
 <211> 418
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> 50F10
 <400> 10

Met Asn Lys Ser Val Ala Pro Leu Leu Leu Ala Ala Ser Ile Leu Tyr
 1 5 10 15

Gly Gly Ala Ala Ala Gln Gln Thr Val Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile
 20 25 30

15

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

Ala Ala Leu Ser Gln Val Thr Asn Pro Asp Gly Ser Thr Thr Asn Leu
290 295 300

Ile Phe Asp Val His Lys Tyr Leu Asp Ser Asp Asn Ser Gly Thr His
305 310 315 320

Ala Glu Cys Thr Thr Asn Asn Ile Asp Gly Ala Phe Ser Pro Leu Ala
325 330 335

Thr Trp Leu Arg Gln Asn Asn Arg Gln Ala Ile Leu Thr Glu Thr Gly
340 345 350

Gly Gly Asn Val Gln Ser Cys Gln Thr Tyr Leu Cys Gln Gln Val Ala
355 360 365

Tyr Leu Asn Ala Asn Ser Asp Val Tyr Leu Gly Tyr Ile Gly Trp Ser
370 375 380

Ala Gly Ser Phe Asp Ser Thr Tyr Val Leu Thr Glu Thr Pro Thr Gly
385 390 395 400

Ser Gly Asn Ser Trp Thr Asp Thr Ser Leu Val Ser Ser Cys Leu Ala
405 410 415

Arg Lys

<210> 11
<211> 1257
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 108G5

<400> 11

atgaacaagt ccgtggctcc attgctgctt gcagcgtcca tactatatgg cggcgccgct	60
gcacagcaga ctgtctgggg ccagtgtgga ggtattgggt ggagcggacc tacgaattgt	120
gctcctggct cagcttgctt gaccctcaat ccttattatg cgcaatgtat tccgggagcc	180
actactatca ccacttcgac ccggccacca tccgggccaa ccaccaccac cagggctacc	240
tcaacaagct catcaactcc acccagcagc tctggggctc gatttgccgg cgtaaacatc	300
gogggttttg actttggctg taccacagat ggcaacttgc ttacctcgaa ggtttatcct	360
cogttgaaga acttcaccgg ctcaaacaac taccocgatg gcacgcggcca gatgcagcac	420
ttcgtcaacg acgacgggat gactattttc cgcttacctg tcggatggca gtacctcgtc	480
aacaacaatt tgggcccga tcttgattcc acgagcattt ccaagtatga tcagcttggt	540
caggggtgcc tgtctctggg cgcatactgc atcgtcgaca tccacaatta tgctcgatgg	600
aacgggtggga tcattgggtc gggcgccctt actaatgtct aattcacgag cctttggctg	660
cagttggcat caaagtacgc atctcagtcg aggggtgtgt tcggcatcat gaatgagccc	720
cacgacgtga acatcaacac ctgggctgcc acgggtccaag aggttgtaac cgcaatccgc	780
aacgctggtg ctacgtcgca attcatctct ttgcctggaa atgattggca atctgctggg	840
gctttcatat ccgatggcag tgcagccgcc ctgtctcaag tcacgaacct ggatgggtca	900
acaacgaatc tgatttttga cgtgcacaaa tacttggtact cagacaactc cgggtactcac	960
gccgaatgta ctacaaataa cattgacggc gccttttctc cgcttgccac ttggctccga	1020
gcaaacggtc gccaggctat cctgacagaa accgggtggt gcaacgttca gtcctgcata	1080
caagacatgt gccagcaaat ccaatatctc aaccagaact cagatgtcta tcttggtat	1140
gttggttggg gtgccggatc atttgatagc acgtatgtcc tgacggaaac accgactggc	1200
agtggtaact catggacgga cacatccttg gtcagctcgt gtctagcaag aaagtag	1257

<210> 12
 <211> 418
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> 108G5

<400> 12

ES 2 682 520 T3

Met Asn Lys Ser Val Ala Pro Leu Leu Leu Ala Ala Ser Ile Leu Tyr
1 5 10 15

Gly Gly Ala Ala Ala Gln Gln Thr Val Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile
20 25 30

Gly Trp Ser Gly Pro Thr Asn Cys Ala Pro Gly Ser Ala Cys Ser Thr
35 40 45

Leu Asn Pro Tyr Tyr Ala Gln Cys Ile Pro Gly Ala Thr Thr Ile Thr
50 55 60

Thr Ser Thr Arg Pro Pro Ser Gly Pro Thr Thr Thr Thr Arg Ala Thr
65 70 75 80

Ser Thr Ser Ser Ser Thr Pro Pro Thr Ser Ser Gly Val Arg Phe Ala
85 90 95

Gly Val Asn Ile Ala Gly Phe Asp Phe Gly Cys Thr Thr Asp Gly Thr
100 105 110

Cys Val Thr Ser Lys Val Tyr Pro Pro Leu Lys Asn Phe Thr Gly Ser
 115 120 125

Asn Asn Tyr Pro Asp Gly Ile Gly Gln Met Gln His Phe Val Asn Asp
 130 135 140

Asp Gly Met Thr Ile Phe Arg Leu Pro Val Gly Trp Gln Tyr Leu Val
 145 150 155 160

Asn Asn Asn Leu Gly Gly Asn Leu Asp Ser Thr Ser Ile Ser Lys Tyr
 165 170 175

Asp Gln Leu Val Gln Gly Cys Leu Ser Leu Gly Ala Tyr Cys Ile Val
 180 185 190

Asp Ile His Asn Tyr Ala Arg Trp Asn Gly Gly Ile Ile Gly Gln Gly
 195 200 205

Gly Pro Thr Asn Ala Gln Phe Thr Ser Leu Trp Ser Gln Leu Ala Ser
 210 215 220

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

His Asp Val Asn Ile Asn Thr Trp Ala Ala Thr Val Gln Glu Val Val
 245 250 255

Thr Ala Ile Arg Asn Ala Gly Ala Thr Ser Gln Phe Ile Ser Leu Pro
 260 265 270

Gly Asn Asp Trp Gln Ser Ala Gly Ala Phe Ile Ser Asp Gly Ser Ala
 275 280 285

Ala Ala Leu Ser Gln Val Thr Asn Pro Asp Gly Ser Thr Thr Asn Leu
 290 295 300

Ile Phe Asp Val His Lys Tyr Leu Asp Ser Asp Asn Ser Gly Thr His
 305 310 315 320

Ala Glu Cys Thr Thr Asn Asn Ile Asp Gly Ala Phe Ser Pro Leu Ala
 325 330 335

Thr Trp Leu Arg Ala Asn Gly Arg Gln Ala Ile Leu Thr Glu Thr Gly
 340 345 350

Gly Gly Asn Val Gln Ser Cys Ile Gln Asp Met Cys Gln Gln Ile Gln
 355 360 365

ES 2 682 520 T3

Tyr Leu Asn Gln Asn Ser Asp Val Tyr Leu Gly Tyr Val Gly Trp Gly
370 375 380

Ala Gly Ser Phe Asp Ser Thr Tyr Val Leu Thr Glu Thr Pro Thr Gly
385 390 395 400

Ser Gly Asn Ser Trp Thr Asp Thr Ser Leu Val Ser Ser Cys Leu Ala
405 410 415

Arg Lys

<210> 13
<211> 1257
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 140F7

<400> 13

atgaacaagt	ccgtggctcc	attgctgctt	gcagcgtcca	tactatatgg	cggcgccgct	60
gcacagcaga	ctgtctgggg	ccagtgtgga	ggtattgggt	ggagcggacc	tacgaattgt	120
gctcctggct	cagcttgctc	gaccctcaat	ccttattatg	cgcaatgtat	tccgggagcc	180
actactatca	ccacttcgac	ccggccacca	tccggtccaa	ccaccaccac	cagggctacc	240
tcaacaagct	catcaactcc	acccacgagc	tctggggctc	gatttgccgg	cgtaaacatc	300
gggggttttg	actttggctg	taccacagat	ggcacttgcg	ttacctcgaa	ggtttatcct	360
ccgttgaaga	acttcaccgg	ctcaaacaac	taccocgatg	gcacggcca	gatgcagcac	420
ttcgtcaacg	acgacgggat	gactattttc	cgcttacctg	toggatggca	gtacctcgtc	480
aacaacgttt	tgggcggcac	acttgattcc	aacaatttcg	caacctatga	ttcacttggt	540
caggggtgcc	tggcaacagg	cgcaagttgc	atcattgaca	tccacaatta	tgctcgatgg	600
aacggtggga	tcattggtca	gggcggccct	actaatgctc	aattcacgag	cctttggtcg	660
cagttggcat	caaagtacgc	atctcagtcg	agggtgtggt	tggcatcat	gaatgagccc	720
cacgaogtga	acatcaacac	ctgggctgcc	acggtccaag	aggttgtaac	cgcaatccgc	780
aacgctgggtg	ctacgtcgca	attcatctct	ttgcctggaa	atgattggca	atctgctggg	840
gctttcatat	ccgatggcag	tgcagccgcc	ctgtctcaag	tcacgaaccc	ggatgggtca	900
acaacgaatc	tgatttttga	cgtgcacaaa	tacttggaact	cagacaactc	cggtactcac	960
gccgaatgta	ctacaaataa	cattgacggc	gccttttctc	cgcttgccac	ttggctccga	1020
cagaacaatc	gccaggctat	cctgacagaa	acgggtgggtg	gcaacgttca	gtcctgcata	1080

ES 2 682 520 T3

caagacatgt gccagcaaat ccaatatotc aaccagaact cagatgtota tcttggtat	1140
gttggttggg gtgccggatc atttgatagc acgtatgtcc tgacggaaac accgactggc	1200
agtggtaact catggacgga cacatccttg gtcagctcgt gtctagcaag aaagtag	1257

<210> 14
 <211> 418
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> 140F7

<400> 14

ES 2 682 520 T3

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

Asp Ile His Asn Tyr Ala Arg Trp Asn Gly Gly Ile Ile Gly Gln Gly
 195 200 205
 Gly Pro Thr Asn Ala Gln Phe Thr Ser Leu Trp Ser Gln Leu Ala Ser
 210 215 220
 Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Arg Val Trp Phe Gly Ile Met Asn Glu Pro
 225 230 235 240
 His Asp Val Asn Ile Asn Thr Trp Ala Ala Thr Val Gln Glu Val Val
 245 250 255
 Thr Ala Ile Arg Asn Ala Gly Ala Thr Ser Gln Phe Ile Ser Leu Pro
 260 265 270
 Gly Asn Asp Trp Gln Ser Ala Gly Ala Phe Ile Ser Asp Gly Ser Ala
 275 280 285
 Ala Ala Leu Ser Gln Val Thr Asn Pro Asp Gly Ser Thr Thr Asn Leu
 290 295 300
 Ile Phe Asp Val His Lys Tyr Leu Asp Ser Asp Asn Ser Gly Thr His
 305 310 315 320
 Ala Glu Cys Thr Thr Asn Asn Ile Asp Gly Ala Phe Ser Pro Leu Ala
 325 330 335
 Thr Trp Leu Arg Gln Asn Asn Arg Gln Ala Ile Leu Thr Glu Thr Gly
 340 345 350
 Gly Gly Asn Val Gln Ser Cys Ile Gln Asp Met Cys Gln Gln Ile Gln
 355 360 365
 Tyr Leu Asn Gln Asn Ser Asp Val Tyr Leu Gly Tyr Val Gly Trp Gly
 370 375 380
 Ala Gly Ser Phe Asp Ser Thr Tyr Val Leu Thr Glu Thr Pro Thr Gly
 385 390 395 400
 Ser Gly Asn Ser Trp Thr Asp Thr Ser Leu Val Ser Ser Cys Leu Ala
 405 410 415
 Arg Lys

<210> 15
 <211> 1257
 <212> ADN

ES 2 682 520 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 146C4

5

<400> 15

```

atgaacaagt cegtggctcc attgctgctt gcagcgcca tactatatgg cggcgccgct      60
gcacagcaga ctgtctgggg ccagtgtgga ggtattggtt ggagcggacc tacgaattgt      120
gctcctggct cagcttgctt gaccctcaat ccttattatg cgcaatgtat tccgggagcc      180
actactatca ccacttcgac cgggccacca tccgggtccaa ccaccaccac cagggctacc      240
tcaacaagct catcaactcc acccagcagc tctgggggtcc gatttgccgg cgtaacatc      300
gcggtgtttt actttggctg taccacagat ggcacttgcg ttacctcgaa ggtttatcct      360
ccgttgaaga acttcaccgg ctcaaacaac taacctcgatg gcacggcca gatgcagcac      420
ttcgtcaacg acgacgggat gactattttc cgcttaacctg toggatggca gtacctgtc      480
aacaacaatt tgggcggcaa tcttgattcc acgagcattt ccaagtatga tcagcttggt      540
caggggtgcc tgtctctggg cgcatactgc atcgtogaca tccacaatta tgctcgatgg      600
aacggtggga tcatttgtca gggcgccct actaatgtc aattcacgag cctttggtcg      660
cagttggcat caaagtacgc atctcagtcg aggggtgtgt toggcatcat gaatgagccc      720
cacgaogtga acatcaacac ctgggctgcc acggtccaag aggttgtaac cgcaatccgc      780
aacgctggtg ctacgtcgca attcatctct ttgcctggaa atgattggca atctgctggg      840
gctttcatat cogatggcag tgcagccgcc ctgtctaaag tcacgaacct ggatgggaca      900
atcacgaatc tgatttttga cgtgcacaaa tacttggaact cagacaactc cggactaat      960
cttgaatgtg tgacaaataa cattgacggc gccttttctc cgcttgccac ttggctccga     1020
cagaacaatc gccaggctat cctgacagaa accggtggtg gcaacgttca gtctgcata     1080
caagacatgt gccagcaaat ccaatatctc aaccagaact cagatgtota tcttggtat     1140
gttggttggg gtgccggatc atttgatagc acgtatgtcc tgacggaaac accgactggc     1200
agtggtaact catggacgga cacatccttg gtcagctcgt gtctagcaag aaagtag      1257

```

10

<210> 16

<211> 418

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> 146C4

<400> 16

20

```

Met Asn Lys Ser Val Ala Pro Leu Leu Leu Ala Ala Ser Ile Leu Tyr
1              5              10              15

```

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

	260		265		270										
Gly	Asn	Asp	Trp	Gln	Ser	Ala	Gly	Ala	Phe	Ile	Ser	Asp	Gly	Ser	Ala
	275						280					285			
Ala	Ala	Leu	Ser	Lys	Val	Thr	Asn	Pro	Asp	Gly	Thr	Ile	Thr	Asn	Leu
	290					295					300				
Ile	Phe	Asp	Val	His	Lys	Tyr	Leu	Asp	Ser	Asp	Asn	Ser	Gly	Thr	Asn
305					310					315					320
Leu	Glu	Cys	Val	Thr	Asn	Asn	Ile	Asp	Gly	Ala	Phe	Ser	Pro	Leu	Ala
				325					330					335	
Thr	Trp	Leu	Arg	Gln	Asn	Asn	Arg	Gln	Ala	Ile	Leu	Thr	Glu	Thr	Gly
			340					345					350		
Gly	Gly	Asn	Val	Gln	Ser	Cys	Ile	Gln	Asp	Met	Cys	Gln	Gln	Ile	Gln
		355					360					365			
Tyr	Leu	Asn	Gln	Asn	Ser	Asp	Val	Tyr	Leu	Gly	Tyr	Val	Gly	Trp	Gly
	370					375					380				
Ala	Gly	Ser	Phe	Asp	Ser	Thr	Tyr	Val	Leu	Thr	Glu	Thr	Pro	Thr	Gly
385					390					395					400
Ser	Gly	Asn	Ser	Trp	Thr	Asp	Thr	Ser	Leu	Val	Ser	Ser	Cys	Leu	Ala
				405					410					415	

Arg Lys

<210> 17
 <211> 1257
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> 149E4

<400> 17

ES 2 682 520 T3

```

atgaacaagt ccgtaggtcc attgctgctt gcagcgtcca tactatatgg cggcgccgct      60
gcacagcaga ctgtctgggg ccagtgtgga ggtattggtt ggagcggacc tacgaattgt      120
gctcctggct cagcttgttc gaccctcaat ccttattatg cgcaatgtat tccgggagcc      180
actactatca ccacttcgac ccggccacca tccggtccaa ccaccaccac cagggctacc      240
tcaacaagct catcaactcc acccagcagc tctggggctc gatttgccgg cgtaacatc      300
gcggtgtttg actttggctg taccacagat ggcacttgcg ttacctcgaa ggtttatcct      360

ccgttgaaga acttcaccgg ctcaaacaac taaccocgatg gcacgcggca gatgtccac      420
ttcgtcaacg acgacgggat gactattttc cgcttacctg tcggatggca gtacctgctc      480
aacaacaatt tgggcggcaa tcttgattcc acgagcattt ccaagtatga tcagcttgtt      540
caggggtgcc tgtctctggg cgcatactgc atcgtcgaca tccacaatta tgctcgatgg      600
aacggtggga tcattggtca gggcgccctc actaatgctc aattcacgag cctttggtcg      660
cagttggcat caaagtacgc atctcagtcg aggggtgtgt tcggcatcat gaatgagccc      720
cacgacgtga acatcaacac ctgggctgcc acggtccaag aggttgtaac cgcaatccgc      780
aacgtggtg ctacgtcgca attcatctct ttgcctggaa atgattggca atctgctggg      840
gctttcatat ccgatggcag tgcagccgcc ctgtctcaag tcacgaaccc ggatgggtca      900
acaacgaatc tgatttttga cgtgcacaaa tacttggtact cagacaactc cgggtactcac      960
gccgaatgtg taacaaataa cattgacgcc gcctttgcac cgcttgccac ttggctccga     1020
gcaaacggtc gccaggctat cctgagcgaa accggtggtg gcaacaccgc gtcctgccag     1080
acatatattgt gccagcaagt tgcttatctc aacgcaaaact cagatgtcta tcttggttat     1140
attggttggg ctgccggatc atttgatagc acgtatgtcc tgacggaaac accgactggc     1200
agtggtaact catggacgga cacatccttg gtcagctcgt gtctagcaag aaagtag         1257

```

<210> 18
 <211> 418
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> 149E4

<400> 18

ES 2 682 520 T3

Met Asn Lys Ser Val Ala Pro Leu Leu Leu Ala Ala Ser Ile Leu Tyr
1 5 10 15

Gly Gly Ala Ala Ala Gln Gln Thr Val Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile
20 25 30

Gly Trp Ser Gly Pro Thr Asn Cys Ala Pro Gly Ser Ala Cys Ser Thr
35 40 45

Leu Asn Pro Tyr Tyr Ala Gln Cys Ile Pro Gly Ala Thr Thr Ile Thr
50 55 60

Thr Ser Thr Arg Pro Pro Ser Gly Pro Thr Thr Thr Thr Arg Ala Thr
65 70 75 80

Ser Thr Ser Ser Ser Thr Pro Pro Thr Ser Ser Gly Val Arg Phe Ala

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

Thr Trp Leu Arg Ala Asn Gly Arg Gln Ala Ile Leu Ser Glu Thr Gly
340 345 350

Gly Gly Asn Thr Ala Ser Cys Gln Thr Tyr Leu Cys Gln Gln Val Ala
355 360 365

Tyr Leu Asn Ala Asn Ser Asp Val Tyr Leu Gly Tyr Ile Gly Trp Ser
370 375 380

Ala Gly Ser Phe Asp Ser Thr Tyr Val Leu Thr Glu Thr Pro Thr Gly
385 390 395 400

Ser Gly Asn Ser Trp Thr Asp Thr Ser Leu Val Ser Ser Cys Leu Ala
405 410 415

Arg Lys

<210> 19
<211> 1257
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 173C6

<400> 19

atgaacaagt ccggtggctcc attgctgctt gcagcgtcca tactatatgg cggcgccgct	60
gcacagcaga ctgtctgggg ccagtgtgga ggtattggtt ggagcggacc tacgaattgt	120
gctcctggct cagcttggtc gaccctcaat ccttattatg cgcaatgtat tccgggagcc	180
actactatca ccacttcgac ccggccaacca tccggtocaa caaccaccac cagggctacc	240
tcaacaagct catcaactcc acccaocgagc tctggggctc gatttgccgg cgtaaacatc	300
gcggtgtttg actttggctg taccacagat ggcacttgcg ttacctcgaa ggtttatcct	360
ccgttgaaga acttcaccgg ctcaaacaac taccocgatg gcacggcca gatgcagcac	420
ttcgtcaacg acgacgggat gactattttc cgcttacctg tcggatggca gtacctcgtc	480
aacaacaatt tgggcggcaa tottgattcc acgagcattt coaagtatga tcagcttggt	540
caggggtgcc tgtctctggg cgcatactgc atcgtcgaca tocacaatta tgctcgatgg	600
aacggtggga tcattggtca gggcgggcct actaatgctc aattcacgag cctttggtcg	660
cagttggcat caaagtacgc atctcagtcg aggggtgtgt tcggcatcat gaatgagccc	720
cacgacgtga acatcaacac ctgggctgcc acggtccaag aggttgtaac cgcaatccgc	780
aacgctggtg ctacgtcgca attcatctct ttgcctggaa atgattggca atctgctggg	840
gctttcatat ccgatggcag tgcagccgcc ctgtctcaag tcacgaaccc ggatgggtca	900
acaacgaatc tgatttttga cgtgcacaaa tacttggtact cagacaactc cgggtactcac	960
gccgaatgta ctacaaataa cattgacacc gcctttgcac cgcttgccac ttggctccga	1020
gcaaacggac gccaggctat cctgacagaa accggtggtg gcaacgttgc ttctgcgag	1080
acatatttgt gccaggaagt tgcttatctc aacgccaaact cagatgtcta tcttggtat	1140
gttggttggg gtgccggatc atttgatagc acgtatgtcc tgacggaaac accgactggc	1200
agtggtaact catggacgga cacatccttg gtcagctcgt gtctagcaag aaagtag	1257

<210> 20
 <211> 418
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> 173C6

<400> 20

ES 2 682 520 T3

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

Asn	Asn	Asn	Leu	Gly	Gly	Asn	Leu	Asp	Ser	Thr	Ser	Ile	Ser	Lys	Tyr	165	170	175	
Asp	Gln	Leu	Val	Gln	Gly	Cys	Leu	Ser	Leu	Gly	Ala	Tyr	Cys	Ile	Val	180	185	190	
Asp	Ile	His	Asn	Tyr	Ala	Arg	Trp	Asn	Gly	Gly	Ile	Ile	Gly	Gln	Gly	195	200	205	
Gly	Pro	Thr	Asn	Ala	Gln	Phe	Thr	Ser	Leu	Trp	Ser	Gln	Leu	Ala	Ser	210	215	220	
Lys	Tyr	Ala	Ser	Gln	Ser	Arg	Val	Trp	Phe	Gly	Ile	Met	Asn	Glu	Pro	225	230	235	240
His	Asp	Val	Asn	Ile	Asn	Thr	Trp	Ala	Ala	Thr	Val	Gln	Glu	Val	Val	245	250	255	
Thr	Ala	Ile	Arg	Asn	Ala	Gly	Ala	Thr	Ser	Gln	Phe	Ile	Ser	Leu	Pro	260	265	270	
Gly	Asn	Asp	Trp	Gln	Ser	Ala	Gly	Ala	Phe	Ile	Ser	Asp	Gly	Ser	Ala	275	280	285	
Ala	Ala	Leu	Ser	Gln	Val	Thr	Asn	Pro	Asp	Gly	Ser	Thr	Thr	Asn	Leu	290	295	300	
Ile	Phe	Asp	Val	His	Lys	Tyr	Leu	Asp	Ser	Asp	Asn	Ser	Gly	Thr	His	305	310	315	320
Ala	Glu	Cys	Thr	Thr	Asn	Asn	Ile	Asp	Thr	Ala	Phe	Ala	Pro	Leu	Ala	325	330	335	
Thr	Trp	Leu	Arg	Ala	Asn	Gly	Arg	Gln	Ala	Ile	Leu	Thr	Glu	Thr	Gly	340	345	350	
Gly	Gly	Asn	Val	Ala	Ser	Cys	Glu	Thr	Tyr	Leu	Cys	Gln	Glu	Val	Ala	355	360	365	
Tyr	Leu	Asn	Ala	Asn	Ser	Asp	Val	Tyr	Leu	Gly	Tyr	Val	Gly	Trp	Gly	370	375	380	
Ala	Gly	Ser	Phe	Asp	Ser	Thr	Tyr	Val	Leu	Thr	Glu	Thr	Pro	Thr	Gly	385	390	395	400
Ser	Gly	Asn	Ser	Trp	Thr	Asp	Thr	Ser	Leu	Val	Ser	Ser	Cys	Leu	Ala	405	410	415	
Arg Lys																			

ES 2 682 520 T3

<210> 21
 <211> 1257
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> 191H11

<400> 21

10

```

atgaacaagt ccgtaggctcc attgctgctt gcagcgtcca tactatatgg cggcgccgct      60
gcacagcaga ctgtctgggg ccagtgtgga ggtattgggt ggagcggacc tacgaattgt      120
gctcctggct cagcttggtc gacctcaat ccttattatg cgcaatgtat tccgggagcc      180
actactatca ccacttcgac cgggccacca tccgggtccaa ccaccaccac cagggctacc      240
tcaacaagct catcaactcc acccacgagc tctgggggtcc gatttgccgg cgттаacatc      300
gcggggttttg actttggctg taccacagat ggcacttgcg ttacctcgaa ggtttatcct      360
ccgttgaaga acttcaccgg ctcaaacaac taccocgatg gcacggcca gatgcagcac      420
ttcgtcaacg acgacgggat gactattttc cgcttacctg tcggatggca gtacctcgtc      480
aacaacaatt tggggggcaa tcttgattcc acgagcattt ccaagtatga tcagcttggt      540
caggggtgcc tgtctctggg cgcatactgc atcgtcgaca tcacaaatta tgctcgatgg      600
aacgggtgga tcattggtca gggcgggcct actaatgttc aattcacgag cctttggctg      660
cagttggcat caaagtacgc atctcagtcg aggggtgtgt tcggcatcat gaatgagccc      720
cacgacgtga acatcaacac ctgggctgcc acgggtccaag aggttgtaac cgcaatccgc      780
aacgctggtg ctacgtcgca attcatctct ttgcctggaa atgattggca atctgctggg      840
gctttcatat ccgatggcag tgcagccgcc ctgtctcaag tcacgaaccc ggatgggtca      900
acaacgaatc tgatttttga cgtgcacaaa tacttggact cagacaactc cgggtactcac      960
gccgaatgta ctacaaataa cattgacgcc gcctttgcac cgcttgccac ttggctccga     1020
gcaaacggtc gccaggctat cctgagcgaa accgggtggt gcaacaccgc gtccctgccag     1080
acatatttgt gccagcaagt tgcttatctc aacgcaaact cagatgtcta tcttggctat     1140
attggttggg ctgccgcatc atttgatagc acgtatgtcc tgacggaaac accgactggc     1200
agtggtaact catggacgga cacatccttg gtcagctcgt gtctagcaag aaagtag      1257
  
```

<210> 22
 <211> 418
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> 191H11

20

<400> 22

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

His Asp Val Asn Ile Asn Thr Trp Ala Ala Thr Val Gln Glu Val Val
245 250 255

Thr Ala Ile Arg Asn Ala Gly Ala Thr Ser Gln Phe Ile Ser Leu Pro
260 265 270

Gly Asn Asp Trp Gln Ser Ala Gly Ala Phe Ile Ser Asp Gly Ser Ala
275 280 285

Ala Ala Leu Ser Gln Val Thr Asn Pro Asp Gly Ser Thr Thr Asn Leu
290 295 300

Ile Phe Asp Val His Lys Tyr Leu Asp Ser Asp Asn Ser Gly Thr His
305 310 315 320

Ala Glu Cys Thr Thr Asn Asn Ile Asp Ala Ala Phe Ala Pro Leu Ala
325 330 335

Thr Trp Leu Arg Ala Asn Gly Arg Gln Ala Ile Leu Ser Glu Thr Gly
340 345 350

Gly Gly Asn Thr Ala Ser Cys Gln Thr Tyr Leu Cys Gln Gln Val Ala
355 360 365

Tyr Leu Asn Ala Asn Ser Asp Val Tyr Leu Gly Tyr Ile Gly Trp Ser
370 375 380

Ala Gly Ser Phe Asp Ser Thr Tyr Val Leu Thr Glu Thr Pro Thr Gly
385 390 395 400

Ser Gly Asn Ser Trp Thr Asp Thr Ser Leu Val Ser Ser Cys Leu Ala
405 410 415

Arg Lys

<210> 23
<211> 1260
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 222E1

<400> 23

ES 2 682 520 T3

```

atgaacaagt cegtggctcc attgctgctt gcagcgtcca tactatatgg cggcgccgct      60
gcacagcaga ctgtctgggg ccagtgtgga ggtattgggt ggagcggacc tacgaattgt      120
gctcctggct cagcttggtc gacctcaat ccttattatg cgcaatgtat tcogggagcc      180
actactatca ccacttogac cgggccaoca tccggtccaa ccaccaccac cagggctacc      240
tcaacaagct catcaactoc acccaogago tctggggtcc gatttgccgg cgtaaacatc      300
gcggtttttg actttggctg taccacagat ggcacttgcg ttacctcgaa ggtttatcct      360
ccgttgaaga acttcaccgg ctcaaacaac taccocgatg gcacgggcca gatgcagcac      420
ttcgtcaacg acgacgggat gactattttc cgcttacctg tcggatggca gtacctcgtc      480
aacaacaatt tgggcggcaa tcttgattcc acgagcattt ccaagtatga tcagcttgtt      540
caggggtgcc tgtctctggg cgcatactgc atcgtcgaca tocacaatta tgctogatgg      600
aacggtggga tcatttgtca gggcgccoct actaatgctc aattcacgag cctttggtcg      660
cagttggcat caaagtacgc atctcagtcg aggggtgtgt toggcatcat gaatgagccc      720
cacgacgtga acatcaacac ctgggctgcc acggtccaag aggttgtaac cgcaatccgc      780
aacgctgggt ctacgtcgca attcatctct ttgcctggaa atgattggca atctgctggg      840
gctttcatat ccgatggcag tgcagccgcc ctgtctcaag tcacgaaccc ggatgggtca      900
acaacgaatc tgatTTTTga cgtgcacaaa tacttggaact cagacaactc cggtaactcac      960
gccgaatgtg taacaaataa cattgacgcc gcctttgcac cgcttgccac ttggctccga     1020
gcaaacggac gccaggctat cctgacagaa accggtgggt gcaacggtgc ttctgctgag     1080
acatatttgt gccaggaagt tgcttatctc aacgcaaact cagatgtcta tcttggctat     1140
gttggttggg ctgccggatc atttgatacg aattatacac tgacggaaac accgaatggc     1200
agtggttcat caatgacgga ccaaccattg gtcgcggtt gtctaactag atcgaattag     1260

```

<210> 24
 <211> 419
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> 222E1

<400> 24

ES 2 682 520 T3

Met Asn Lys Ser Val Ala Pro Leu Leu Leu Ala Ala Ser Ile Leu Tyr
1 5 10 15

Gly Gly Ala Ala Ala Gln Gln Thr Val Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile
20 25 30

Gly Trp Ser Gly Pro Thr Asn Cys Ala Pro Gly Ser Ala Cys Ser Thr
35 40 45

Leu Asn Pro Tyr Tyr Ala Gln Cys Ile Pro Gly Ala Thr Thr Ile Thr
50 55 60

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

Ala Glu Cys Val Thr Asn Asn Ile Asp Ala Ala Phe Ala Pro Leu Ala
325 330 335

Thr Trp Leu Arg Ala Asn Gly Arg Gln Ala Ile Leu Thr Glu Thr Gly
340 345 350

Gly Gly Asn Val Ala Ser Cys Glu Thr Tyr Leu Cys Gln Glu Val Ala
355 360 365

Tyr Leu Asn Ala Asn Ser Asp Val Tyr Leu Gly Tyr Val Gly Trp Ala
370 375 380

Ala Gly Ser Phe Asp Thr Asn Tyr Thr Leu Thr Glu Thr Pro Asn Gly
385 390 395 400

Ser Gly Ser Ser Met Thr Asp Gln Pro Leu Val Ala Ala Cys Leu Thr
405 410 415

Arg Ser Asn

<210> 25
<211> 1260
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 225C7

<400> 25

atgaacaagt ccgtggctcc attgctgctt gcagcgtcca tactatatgg cggcgccgct 60
gcacagcaga ctgtctgggg ccagtgtgga ggtattggtt ggagcggacc tacgaattgt 120
gctcctggct cagcttgctt gaccctcaat ccttattatg cgcaatgtat tccgggagcc 180
actactatca ccaactcgac ccggccacca tccgggtcca ccaccaccac cagggctacc 240
tcaacaagct catcaactcc acccagcagc tctgggggtcc gatttgccgg cgtaacatc 300
gcggtgtttt actttggctg taccacagat ggcacttgcg ttacctcgaa ggtttatcct 360
ccgttgaaga acttcaccgg ctcaaacaac taocccgatg gcctcggcca gatgtccac 420
ttcgtcaaaa gcacaggga caatattttc cgcttaoctg toggatggca gtacctgctc 480
aacaacgttt tgggcggcac acttgattcc aacaatttcg caacctatga ttcacttggt 540
caggggtgcc tggcaacagg cgcaagttgc atcattgaca tccacaatta tgctcgatgg 600
aacggtggga tcattggtca gggcggccct actaatgctc aattcacgag cctttggtcg 660
cagttggcat caaagtacgc atctcagtcg aggggtggtg toggcatcat gaatgagccc 720

cacgacgtga acatcaacac ctgggctgcc acggtccaag aggttgtaac cgcaatccgc	780
aacgctggtg ctacgtcgca attcatctct ttgcctggaa atgattggca atctgctggg	840
gctttcatat ccgatggcag tgcagccgcc ctgtctcaag tcacgaaccc ggatgggtca	900
acaacgaatc tgatTTTTga cgtgcacaaa tacttggact cagacaactc cgttactcac	960
gccgaatgta ctacaaataa cattgacggc gcotTTTTctc cgcttgccac ttggctccga	1020
gcaaacggac gccaggctat cctgagcgaa accggtggtg gcaacacgc gtctgcccag	1080
acatatttgt gccagcaagt tgcttatctc aacgcaaact cagatgtcta tcttggctat	1140
attggttggc ctgccggatc atttgatagc acgtatatcc tgacggaaac accgaatggc	1200
agtggttctt caatgacgga ccaagcgttg gtcgcggctt gtctaactag aacatcgtag	1260

<210> 26
 <211> 419
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> 225C7

<400> 26

ES 2 682 520 T3

Met	Asn	Lys	Ser	Val	Ala	Pro	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Ser	Ile	Leu	Tyr	1	5	10	15
Gly	Gly	Ala	Ala	Ala	Gln	Gln	Thr	Val	Trp	Gly	Gln	Cys	Gly	Gly	Ile	20	25	30	
Gly	Trp	Ser	Gly	Pro	Thr	Asn	Cys	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	Cys	Ser	Thr	35	40	45	
Leu	Asn	Pro	Tyr	Tyr	Ala	Gln	Cys	Ile	Pro	Gly	Ala	Thr	Thr	Ile	Thr	50	55	60	
Thr	Ser	Thr	Arg	Pro	Pro	Ser	Gly	Pro	Thr	Thr	Thr	Thr	Arg	Ala	Thr	65	70	75	80
Ser	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Pro	Pro	Thr	Ser	Ser	Gly	Val	Arg	Phe	Ala	85	90	95	
Gly	Val	Asn	Ile	Ala	Gly	Phe	Asp	Phe	Gly	Cys	Thr	Thr	Asp	Gly	Thr	100	105	110	
Cys	Val	Thr	Ser	Lys	Val	Tyr	Pro	Pro	Leu	Lys	Asn	Phe	Thr	Gly	Ser	115	120	125	
Asn	Asn	Tyr	Pro	Asp	Gly	Leu	Gly	Gln	Met	Ser	His	Phe	Val	Lys	Ser	130	135	140	

Thr	Gly	His	Asn	Ile	Phe	Arg	Leu	Pro	Val	Gly	Trp	Gln	Tyr	Leu	Val
145					150					155					160
Asn	Asn	Val	Leu	Gly	Gly	Thr	Leu	Asp	Ser	Asn	Asn	Phe	Ala	Thr	Tyr
				165					170					175	
Asp	Ser	Leu	Val	Gln	Gly	Cys	Leu	Ala	Thr	Gly	Ala	Ser	Cys	Ile	Ile
			180					185					190		
Asp	Ile	His	Asn	Tyr	Ala	Arg	Trp	Asn	Gly	Gly	Ile	Ile	Gly	Gln	Gly
		195					200					205			
Gly	Pro	Thr	Asn	Ala	Gln	Phe	Thr	Ser	Leu	Trp	Ser	Gln	Leu	Ala	Ser
	210					215					220				
Lys	Tyr	Ala	Ser	Gln	Ser	Arg	Val	Trp	Phe	Gly	Ile	Met	Asn	Glu	Pro
225					230					235					240
His	Asp	Val	Asn	Ile	Asn	Thr	Trp	Ala	Ala	Thr	Val	Gln	Glu	Val	Val
			245						250					255	
Thr	Ala	Ile	Arg	Asn	Ala	Gly	Ala	Thr	Ser	Gln	Phe	Ile	Ser	Leu	Pro
			260					265					270		
Gly	Asn	Asp	Trp	Gln	Ser	Ala	Gly	Ala	Phe	Ile	Ser	Asp	Gly	Ser	Ala
		275					280					285			
Ala	Ala	Leu	Ser	Gln	Val	Thr	Asn	Pro	Asp	Gly	Ser	Thr	Thr	Asn	Leu
	290					295					300				
Ile	Phe	Asp	Val	His	Lys	Tyr	Leu	Asp	Ser	Asp	Asn	Ser	Gly	Thr	His
305					310					315					320
Ala	Glu	Cys	Thr	Thr	Asn	Asn	Ile	Asp	Gly	Ala	Phe	Ser	Pro	Leu	Ala
				325					330					335	
Thr	Trp	Leu	Arg	Ala	Asn	Gly	Arg	Gln	Ala	Ile	Leu	Ser	Glu	Thr	Gly
			340					345					350		
Gly	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser	Cys	Gln	Thr	Tyr	Leu	Cys	Gln	Gln	Val	Ala
		355					360					365			
Tyr	Leu	Asn	Ala	Asn	Ser	Asp	Val	Tyr	Leu	Gly	Tyr	Ile	Gly	Trp	Ser
	370					375					380				
Ala	Gly	Ser	Phe	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ile	Leu	Thr	Glu	Thr	Pro	Asn	Gly

ES 2 682 520 T3

385 390 395 400

Ser Gly Ser Ser Met Thr Asp Gln Ala Leu Val Ala Ala Cys Leu Thr
405 410 415

Arg Thr Ser

<210> 27
<211> 1248
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 227C4

<400> 27

```

atgaacaagt ccgtaggtcc attgctgctt gcagcgtcca tactatatgg cggcgccgct      60
gcacagcaga ctgtctgggg ccagtgtgga ggtattgggt ggagcggacc tacgaattgt      120
gctcctggct cagcttggtc gacctcaat ccttattatg cgcaatgtat tccgggagcc      180
actactatca ccacttcgac cgggccacca tccgggtccaa ccaccaccac cagggctacc      240
tcaacaagct catcaactcc acccagcagc tctgggggtcc gatttgccgg cgtaaacatc      300
gcgggttttg actttggctg taccacagat ggcacttgcc taaccaataa ggtttatcct      360
gctttgagtt cctcaacaa cggccccgat ggcctgggccc agatggccca ctctgtctcc      420
aaaactgggc ataataatctt ccgcttacct gtccgatggc agtacctcgt caacaacaat      480
ttgggcggca cacttgattc ctccaacctt gcgacctatg atttgcttgt tcaggggtgc      540
ctgtctctgg gcgcatactg catcgtcgac atccacaatt atgctcgatg gaacgggtgg      600
atcattggtc agggcggccc tactaatgct caattcacga gcctttggtc gcagttggca      660
tcaaagtacg catctcagtc gaggggtgtg ttccggcatca tgaatgagcc ccacgacgtg      720
aacatcaaca cctgggctgc cagcgtccaa gaggttgtaa ccgcaatccg caacgctggt      780
gctacgtcgc aattcatctc tttgcttgga aatgattggc aatctgctgg ggctttcata      840
tccgatggca gtgcagccgc cctgtctcaa gtcacgaacc cggatgggtc aacaacgaat      900
ctgatttttg acgtgcacaa atacttgac tcagacaact ccgttactca cgcgcaatgt      960
gtaacaaata acattgacgc cgcctttgca ccgcttgcca cttggctccg agcaaacggt      1020
cgccaggcta tctgacaga aaccggtggt ggcaacgttc agtcctgcat acaagacatg      1080
tgccagcaaa tocaatatct caaccagaac tcagatgtct atcttggtta tggttggttg      1140
ggtgccggat catttgatag cacgtatgtc ctgacggaaa caccgactgg cagtggtaac      1200
tcatggacgg acacatcctt ggtcagctcg tgtctagcaa gaaagtag      1248

```

<210> 28
<211> 415
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 227C4

5

<400> 28

Met Asn Lys Ser Val Ala Pro Leu Leu Leu Ala Ala Ser Ile Leu Tyr
 1 5 10 15

Gly Gly Ala Ala Ala Gln Gln Thr Val Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile
 20 25 30

Gly Trp Ser Gly Pro Thr Asn Cys Ala Pro Gly Ser Ala Cys Ser Thr
 35 40 45

Leu Asn Pro Tyr Tyr Ala Gln Cys Ile Pro Gly Ala Thr Thr Ile Thr
 50 55 60

Thr Ser Thr Arg Pro Pro Ser Gly Pro Thr Thr Thr Thr Arg Ala Thr
 65 70 75 80

Ser Thr Ser Ser Ser Thr Pro Pro Thr Ser Ser Gly Val Arg Phe Ala
 85 90 95

Gly Val Asn Ile Ala Gly Phe Asp Phe Gly Cys Thr Thr Asp Gly Thr
 100 105 110

Cys Leu Thr Asn Lys Val Tyr Pro Ala Leu Ser Ser Leu Asn Asn Gly
 115 120 125

Pro Asp Gly Leu Gly Gln Met Ala His Phe Val Ser Lys Thr Gly His
 130 135 140

Asn Ile Phe Arg Leu Pro Val Gly Trp Gln Tyr Leu Val Asn Asn Asn
 145 150 155 160

Leu Gly Gly Thr Leu Asp Ser Ser Asn Leu Ala Thr Tyr Asp Leu Leu
 165 170 175

Val Gln Gly Cys Leu Ser Leu Gly Ala Tyr Cys Ile Val Asp Ile His
 180 185 190

Asn Tyr Ala Arg Trp Asn Gly Gly Ile Ile Gly Gln Gly Gly Pro Thr
 195 200 205

Asn Ala Gln Phe Thr Ser Leu Trp Ser Gln Leu Ala Ser Lys Tyr Ala

210	215	220
Ser Gln Ser Arg Val Trp Phe Gly Ile Met Asn Glu Pro His Asp Val		
225	230	235
Asn Ile Asn Thr Trp Ala Ala Thr Val Gln Glu Val Val Thr Ala Ile		
	245	250
Arg Asn Ala Gly Ala Thr Ser Gln Phe Ile Ser Leu Pro Gly Asn Asp		
	260	265
Trp Gln Ser Ala Gly Ala Phe Ile Ser Asp Gly Ser Ala Ala Ala Leu		
	275	280
Ser Gln Val Thr Asn Pro Asp Gly Ser Thr Thr Asn Leu Ile Phe Asp		
290	295	300
Val His Lys Tyr Leu Asp Ser Asp Asn Ser Gly Thr His Ala Glu Cys		
305	310	315
Val Thr Asn Asn Ile Asp Ala Ala Phe Ala Pro Leu Ala Thr Trp Leu		
	325	330
Arg Ala Asn Gly Arg Gln Ala Ile Leu Thr Glu Thr Gly Gly Gly Asn		
	340	345
Val Gln Ser Cys Ile Gln Asp Met Cys Gln Gln Ile Gln Tyr Leu Asn		
	355	360
Gln Asn Ser Asp Val Tyr Leu Gly Tyr Val Gly Trp Gly Ala Gly Ser		
370	375	380
Phe Asp Ser Thr Tyr Val Leu Thr Glu Thr Pro Thr Gly Ser Gly Asn		
385	390	395
Ser Trp Thr Asp Thr Ser Leu Val Ser Ser Cys Leu Ala Arg Lys		
	405	410
		415

<210> 29
 <211> 1257
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> 229D1

<400> 29

ES 2 682 520 T3

```

atgaacaagt ccgtggctcc attgctgctt gcagcgtcca tactatatgg cggcgccgct      60
gcacagcaga ctgtctgggg ccagtgtgga ggtattgggt ggagcggacc tacgaattgt      120

gctcctggct cagcttgctt gaccctcaat ccttattatg cgcaatgtat tccgggagcc      180
actactatca ccacttcgac ccggccacca tccgggtcaa ccaccaccac cagggctacc      240
tcaacaagct catcaactcc acccagcagc totggggctcc gatttgccgg cgttaacatc      300
gcggggtttt actttggctg taccacagat ggcacttgcg ttacctcgaa ggtttatcct      360
ccgttgaaga acttcaccgg ctcaaacaac taccocgatg gcacggcca gatgcagcac      420
ttcgtcaacg acgacgggat gactattttc cgcttacctg tcggatggca gtacctcgtc      480
aacaacaatt tgggcggcaa tcttgattcc acgagcattt ccaagtatga tcagcttggt      540
caggggtgcc tgtctctggg cgcatactgc atcgtcgaca tccacaatta tgctcgatgg      600
aacggtggga tcattgggtc gggcggccct actaatgctc aattcacgag cctttggctc      660
cagttggcat caaagtacgc atctcagtcg aggggtgtgt tcggcatcat gaatgagccc      720
cacgacgtga acatcaacac ctgggctgcc acggtccaag aggttgtaac cgcaatccgc      780
aacgctggtg ctacgtcgca attcatctct ttgcctggaa atgattggca atctgctggg      840
gctttcatat ccgatggcag tgcagccgcc ctgtctcaag tcacgaaccc ggatgggtca      900
acaacgaatc tgatttttga cgtgcacaaa tacttggaact cagacaactc cggtaactcac      960
gccgaatgta ctacaaataa cattgacggc gccttttctc cgcttgccac ttggctccga     1020
cagaacaatc gccaggctat cctgacagaa accggtggtg gcaacaccgc gtcccgccag     1080
acatatttgt gccagcaagt tgcttatctc aacgcaaact cagatgtcta tcttggtat      1140
attggttggg ctgcoggatc atttgatagc acgtatattc tgacggaaac accgactggc     1200
agtggtaact catggacgga cacatccttg gtcagctcgt gtctagcaag aaagtag      1257

```

<210> 30
 <211> 418
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> 229D1

<400> 30

ES 2 682 520 T3

Met Asn Lys Ser Val Ala Pro Leu Leu Leu Ala Ala Ser Ile Leu Tyr
1 5 10 15

Gly Gly Ala Ala Ala Gln Gln Thr Val Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile
20 25 30

Gly Trp Ser Gly Pro Thr Asn Cys Ala Pro Gly Ser Ala Cys Ser Thr
35 40 45

Leu Asn Pro Tyr Tyr Ala Gln Cys Ile Pro Gly Ala Thr Thr Ile Thr

ES 2 682 520 T3

50		55		60
Thr 65	Ser 66	Thr 67	Arg 68	Pro 69
		Pro 70	Ser 71	Gly 72
			Pro 73	Thr 74
			Thr 75	Thr 76
			Thr 77	Arg 78
			Ala 79	Thr 80
Ser 81	Thr 82	Ser 83	Ser 84	Ser 85
			Thr 86	Pro 87
			Pro 88	Thr 89
			Ser 90	Ser 91
			Gly 92	Val 93
			Arg 94	Phe 95
			Ala 96	
Gly 100	Val 101	Asn 102	Ile 103	Ala 104
			Gly 105	Phe 106
			Asp 107	Phe 108
			Gly 109	Cys 110
			Thr 111	Thr 112
			Asp 113	Gly 114
			Thr 115	Ser 116
Cys 117	Val 118	Thr 119	Ser 120	Lys 121
			Val 122	Tyr 123
			Pro 124	Pro 125
			Leu 126	Lys 127
			Asn 128	Phe 129
			Thr 130	Gly 131
			Ser 132	
Asn 133	Asn 134	Tyr 135	Pro 136	Asp 137
			Gly 138	Ile 139
			Gly 140	Gln 141
			Met 142	Gln 143
			His 144	Phe 145
			Val 146	Asn 147
			Asp 148	
Asp 149	Gly 150	Met 151	Thr 152	Ile 153
			Phe 154	Arg 155
			Leu 156	Pro 157
			Val 158	Gly 159
			Trp 160	Gln 161
			Tyr 162	Leu 163
			Val 164	
Asn 165	Asn 166	Asn 167	Leu 168	Gly 169
			Gly 170	Asn 171
			Leu 172	Asp 173
			Ser 174	Thr 175
			Ser 176	Ile 177
			Ser 178	Lys 179
			Tyr 180	
Asp 181	Gln 182	Leu 183	Val 184	Gln 185
			Gly 186	Cys 187
			Leu 188	Ser 189
			Leu 190	Gly 191
			Ala 192	Tyr 193
			Cys 194	Ile 195
			Val 196	
Asp 197	Ile 198	His 199	Asn 200	Tyr 201
			Ala 202	Arg 203
			Trp 204	Asn 205
			Gly 206	Gly 207
			Ile 208	Ile 209
			Gly 210	Gln 211
			Leu 212	Ala 213
			Ser 214	
Gly 215	Pro 216	Thr 217	Asn 218	Ala 219
			Gln 220	Phe 221
			Thr 222	Ser 223
			Leu 224	Trp 225
			Phe 226	Gly 227
			Ile 228	Met 229
			Asn 230	Glu 231
			Pro 232	
Lys 233	Tyr 234	Ala 235	Ser 236	Gln 237
			Ser 238	Arg 239
			Val 240	Trp 241
			Ala 242	Ala 243
			Thr 244	Val 245
			Gln 246	Glu 247
			Val 248	Val 249
Thr 250	Ala 251	Ile 252	Arg 253	Asn 254
			Ala 255	Gly 256
			Ala 257	Thr 258
			Ser 259	Gln 260
			Phe 261	Ile 262
			Ser 263	Asp 264
			Gly 265	Ser 266
			Thr 267	Thr 268
			Asn 269	Leu 270
Gly 271	Asn 272	Asp 273	Trp 274	Gln 275
			Ser 276	Ala 277
			Gly 278	Ala 279
			Phe 280	Ile 281
			Ser 282	Asp 283
			Gly 284	Ser 285
			Ala 286	
Ala 287	Ala 288	Leu 289	Ser 290	Gln 291
			Val 292	Thr 293
			Asn 294	Pro 295
			Asp 296	Gly 297
			Ser 298	Thr 299
			Thr 300	Asn 301
			Leu 302	

Ile Phe Asp Val His Lys Tyr Leu Asp Ser Asp Asn Ser Gly Thr His
305 310 315 320

Ala Glu Cys Thr Thr Asn Asn Ile Asp Gly Ala Phe Ser Pro Leu Ala
325 330 335

Thr Trp Leu Arg Gln Asn Asn Arg Gln Ala Ile Leu Thr Glu Thr Gly
340 345 350

Gly Gly Asn Thr Ala Ser Cys Gln Thr Tyr Leu Cys Gln Gln Val Ala
355 360 365

Tyr Leu Asn Ala Asn Ser Asp Val Tyr Leu Gly Tyr Ile Gly Trp Ser
370 375 380

Ala Gly Ser Phe Asp Ser Thr Tyr Ile Leu Thr Glu Thr Pro Thr Gly
385 390 395 400

Ser Gly Asn Ser Trp Thr Asp Thr Ser Leu Val Ser Ser Cys Leu Ala
405 410 415

Arg Lys

<210> 31
<211> 1257
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 231C9

<400> 31

ES 2 682 520 T3

```

atgaacaagt ccgtggctcc attgctgctt gcagcgtcca tactatatgg cggcgccgct      60
gcacagcaga ctgtctgggg ccagtgtgga ggtattgggt ggagcggacc tacgaattgt      120
gctcctggct cagcttggtc gaccctcaat ccttattatg cgcaatgtat tccggggagcc      180
actactatca ccacttcgac cgggccacca tccgggtccaa ccaccaccac cagggtacc      240
tcaacaagct catcaactcc acccacgagc tctgggggtcc gatttgccgg cgttaacatc      300
gcgggttttg actttggctg taccacagat ggcacttgcg ttacctogaa ggtttatcct      360
ccgttgaaga acttcaccgg ctcaaacaac taccocgatg gcatoggcca gatgcagcac      420
ttcgtcaacg acgacgggat gactattttc cgcttacctg tcggatggca gtacctcgtc      480
aacaacaatt tgggcgggcaa tcttgattcc acgagcattt ccaagtatga tcagcttggt      540
caggggtgcc tgtctctggg cgcatactgc atcgctcgaca tccacaatta tgctogatgg      600
aacggtggga tcattggtca gggcggccct actaatgctc aattcacgag cctttggtcg      660
cagttggcat caaagtacgc atctcagtcg aggggtgtgg tggcatcat gaatgagccc      720
cacgacgtga acatcaacac ctgggctgcc acggtccaag aggttgtaac cgcaatccgc      780
aacgctggtg ctacgtcgca attcatctct ttgcctggaa atgattggca atctgctggg      840
gctttcatat ccgatggcag tgcagccgcc ctgtctcaag tcacgaaccc ggatgggtca      900
acaacgaatc tgatttttga cgtgcacaaa tacttggtact cagacaactc cggtaactcac      960
gcgaatgtg taacaaataa cattgaogcc goctttgcac cgottgccac ttggtccga      1020
gcaaacggtc gccaggctat cctgagcgaa accggtggtg gcaacacgcg gtccctgccag      1080
acatatttgt gccagcaagt tgcttatctc aacgcaaact cagatgtcta tcttggtat      1140
attggttggg gtgccggatc atttgatagc acgtatgtcc tgacggaaac accgactggc      1200
agtggtaact catggacgga cacatccttg gtcagctcgt gtctagcaag aaagtag      1257

```

<210> 32
 <211> 418
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> 231C9

<400> 32

ES 2 682 520 T3

Met	Asn	Lys	Ser	Val	Ala	Pro	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Ser	Ile	Leu	Tyr
1				5					10					15	
Gly	Gly	Ala	Ala	Ala	Gln	Gln	Thr	Val	Trp	Gly	Gln	Cys	Gly	Gly	Ile
			20					25					30		
Gly	Trp	Ser	Gly	Pro	Thr	Asn	Cys	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	Cys	Ser	Thr
		35					40					45			
Leu	Asn	Pro	Tyr	Tyr	Ala	Gln	Cys	Ile	Pro	Gly	Ala	Thr	Thr	Ile	Thr
	50					55					60				
Thr	Ser	Thr	Arg	Pro	Pro	Ser	Gly	Pro	Thr	Thr	Thr	Thr	Arg	Ala	Thr
65					70					75					80
Ser	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Pro	Pro	Thr	Ser	Ser	Gly	Val	Arg	Phe	Ala
				85					90					95	
Gly	Val	Asn	Ile	Ala	Gly	Phe	Asp	Phe	Gly	Cys	Thr	Thr	Asp	Gly	Thr
			100					105					110		
Cys	Val	Thr	Ser	Lys	Val	Tyr	Pro	Pro	Leu	Lys	Asn	Phe	Thr	Gly	Ser
		115					120					125			

Asn Asn Tyr Pro Asp Gly Ile Gly Gln Met Gln His Phe Val Asn Asp
 130 135 140

Asp Gly Met Thr Ile Phe Arg Leu Pro Val Gly Trp Gln Tyr Leu Val
 145 150 155 160

Asn Asn Asn Leu Gly Gly Asn Leu Asp Ser Thr Ser Ile Ser Lys Tyr
 165 170 175

Asp Gln Leu Val Gln Gly Cys Leu Ser Leu Gly Ala Tyr Cys Ile Val
 180 185 190

Asp Ile His Asn Tyr Ala Arg Trp Asn Gly Gly Ile Ile Gly Gln Gly
 195 200 205

Gly Pro Thr Asn Ala Gln Phe Thr Ser Leu Trp Ser Gln Leu Ala Ser
 210 215 220

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

His Asp Val Asn Ile Asn Thr Trp Ala Ala Thr Val Gln Glu Val Val
 245 250 255

Thr Ala Ile Arg Asn Ala Gly Ala Thr Ser Gln Phe Ile Ser Leu Pro
 260 265 270

Gly Asn Asp Trp Gln Ser Ala Gly Ala Phe Ile Ser Asp Gly Ser Ala
 275 280 285

Ala Ala Leu Ser Gln Val Thr Asn Pro Asp Gly Ser Thr Thr Asn Leu
 290 295 300

Ile Phe Asp Val His Lys Tyr Leu Asp Ser Asp Asn Ser Gly Thr His
 305 310 315 320

Ala Glu Cys Val Thr Asn Asn Ile Asp Ala Ala Phe Ala Pro Leu Ala
 325 330 335

Thr Trp Leu Arg Ala Asn Gly Arg Gln Ala Ile Leu Ser Glu Thr Gly
 340 345 350

Gly Gly Asn Thr Ala Ser Cys Gln Thr Tyr Leu Cys Gln Gln Val Ala
 355 360 365

Tyr Leu Asn Ala Asn Ser Asp Val Tyr Leu Gly Tyr Ile Gly Trp Gly
 370 375 380

Ala Gly Ser Phe Asp Ser Thr Tyr Val Leu Thr Glu Thr Pro Thr Gly
385 390 395 400

Ser Gly Asn Ser Trp Thr Asp Thr Ser Leu Val Ser Ser Cys Leu Ala
405 410 415

Arg Lys

<210> 33
<211> 1260
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> 330F9

<400> 33

atgaacaagt	ccgtggctcc	attgctgott	gcagcgcca	tactatatgg	cgccgcgct	60
gcacagcaga	ctgtctgggg	ccagtgtgga	ggtattggtt	ggagcggacc	tacgaattgt	120
gctcctggct	cagcttggtc	gaccctcaat	ccttattatg	cgcaatgtat	tcggggagcc	180
actactatca	ccacttcgac	ccggccacca	tcgggtccaa	ccaccaccac	cagggctacc	240
tcaacaagct	catcaactcc	acccacgagc	tctggggtcc	gatttgccgg	cgtaaacatc	300
gcggtgtttg	actttggctg	taccacagat	ggcacttgcg	ttacctcgaa	ggtttatcct	360
cogttgaaga	acttcaccgg	ctcaaacaac	taccocgatg	gcacgggcca	gatgcagcac	420
ttcgtcaacg	acgacgggat	gactatcttc	cgcttacctg	tcggatggca	gtacctcgtc	480
aacaacaatt	tgggcggcaa	tcttgattcc	acgagcattt	ccaagtatga	tcagcttggt	540
caggggtgcc	tgtctctggg	cgcatactgc	atcgctcgaca	tccacaatta	tgctcgatgg	600
aacggtggga	tcatttgtca	ggcgggccct	actaatgctc	aattcacgag	cctttggtcg	660
cagttggcat	caaagtacgc	atctcagtcg	agggtgtggt	tcggcatcat	gaatgagccc	720
cacgacgtga	acatcaacac	ctgggctgcc	acggtccaag	aggttgtaac	cgcaatccgc	780
aacgctgggtg	ctacgtcgca	attcatctct	ttgcctggaa	atgattggca	atctgctggg	840
gctttcatat	ccgatggcag	tgacgcggcc	ctgtctcaag	tcacgaaccc	ggatgggtca	900
acaacgaatc	tgatctttga	cgtgcacaaa	tacttggtact	cagacaactc	cggtactcac	960
gccgaatgtg	taacaaataa	cattgacgcc	gcctttgcac	cgcttgccac	ttggctccga	1020
gcaaacggtc	gccaggctat	cctgagcgaa	accggtggtg	gcaacaccgc	gtcctgccag	1080
acatatttgt	gccagcaagt	tgcttatctc	aacgcaaact	cagatgtcta	tcttggttat	1140
gttggttggg	ctgccggatc	atttgatacg	aattatacac	tgacggaaac	accgaatggc	1200
agtggttctt	caatgacgga	ccaagcggtg	gtcgcggtt	gtctaactag	atcgaattag	1260

<210> 34
<211> 419

ES 2 682 520 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> 330F9

<400> 34

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

Gly Pro Thr Asn Ala Gln Phe Thr Ser Leu Trp Ser Gln Leu Ala Ser
 210 215 220

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

His Asp Val Asn Ile Asn Thr Trp Ala Ala Thr Val Gln Glu Val Val
 245 250 255

Thr Ala Ile Arg Asn Ala Gly Ala Thr Ser Gln Phe Ile Ser Leu Pro
 260 265 270

Gly Asn Asp Trp Gln Ser Ala Gly Ala Phe Ile Ser Asp Gly Ser Ala
 275 280 285

Ala Ala Leu Ser Gln Val Thr Asn Pro Asp Gly Ser Thr Thr Asn Leu
 290 295 300

Ile Phe Asp Val His Lys Tyr Leu Asp Ser Asp Asn Ser Gly Thr His
 305 310 315 320

Ala Glu Cys Val Thr Asn Asn Ile Asp Ala Ala Phe Ala Pro Leu Ala
 325 330 335

Thr Trp Leu Arg Ala Asn Gly Arg Gln Ala Ile Leu Ser Glu Thr Gly
 340 345 350

Gly Gly Asn Thr Ala Ser Cys Gln Thr Tyr Leu Cys Gln Gln Val Ala
 355 360 365

Tyr Leu Asn Ala Asn Ser Asp Val Tyr Leu Gly Tyr Val Gly Trp Ala
 370 375 380

Ala Gly Ser Phe Asp Thr Asn Tyr Thr Leu Thr Glu Thr Pro Asn Gly
 385 390 395 400

Ser Gly Ser Ser Met Thr Asp Gln Ala Leu Val Ala Ala Cys Leu Thr
 405 410 415

Arg Ser Asn

<210> 35
 <211> 1236
 <212> ADN
 <213> *Botryotinia fuckeliana*
 <400> 35

atgaagctct ccaccacogt atacacagtt gttcctttcc tgtctaccgc caccgcacag 60
 ggcggttgctt acgcacagtg tggaggtaat ggttggaactg gatctacggc ttgtgtgtca 120
 ggctatgctt gttcgtatgt gaatgcgtat tattcgcaat gtttgccggg aactgcaact 180
 ttaaccactg ttaccagtgc aaccaccagt gctagttcga aaacaagcac agccgcagca 240
 cccaatagca cggggaagac aaaatatatc ggcaccaaca tcgcgggttt tgactttggc 300
 tgtaccacag atggcacttg cctaaccaat aaggttttatc ctgctttgag ttccctcaac 360
 aacggccocg atggcctggg ccagatggcc cacttctgtc ccaaaactgg gcataatatt 420
 ttccgcttac ctgtcggatg gcagtaacct gtcaacaaca atttggcgcg cacacttgat 480
 tcctccaacc ttgcgacctg tgatttgctt gttcaggggt gcctggcaac gggcgcaact 540
 tgcgtgattg acatccacaa ttatgctcga tggaaagggt caatcattgg tcaggcgggc 600
 cctactgatg ctcaattcgc tagcctttgg tcgcagttgg caacgaagta caagtctaact 660
 acgaagggtg tcttcggctt gatgaatgag cccacgact tgaacagcat caccacctgg 720
 gctgccacgc ttcaaacagt tgtaaccgca atccggcagg ctggtgctac gtcgacctg 780
 cttctattgc ctggaagtga ttacacatct gctggggctt tcataaccga tggcagtga 840
 gccgccctgt ctaagatcac gaacctcgat gggactacaa cgaatctgat ttttgacgtg 900
 cacaaatact tggactcaga caactccggt actcacgcog aatgtgtaac aaataacatt 960
 gacgcgcctt ttgcaccgct tgccacttgg ctccgagcaa acggtcgcca ggctatcctg 1020
 agcgaaaccg gtggtggcaa caccgcgtcc tgccagacat atttgtgcca gcaagttgct 1080
 tatctcaacg caaactcaga tgtctatctt ggctatattg gttggtctgc cggatcattt 1140
 gatagcacgt atattctgac ggaaacacog aatggcagtg gttcttcaat gacggaccaa 1200
 gcgttggtcg cggcttgtct aactagaaca tcgtag 1236

<210> 36

<211> 411

<212> PRT

<213> *Botryotinia fuckeliana*

<400> 36

Met Lys Leu Ser Thr Thr Val Tyr Thr Val Val Pro Phe Leu Ser Thr
 1 5 10 15

Ala Thr Ala Gln Gly Val Ala Tyr Ala Gln Cys Gly Gly Asn Gly Trp
 20 25 30

Thr Gly Ser Thr Ala Cys Val Ser Gly Tyr Ala Cys Ser Tyr Val Asn
 35 40 45

Ala Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu Pro Gly Thr Ala Thr Leu Thr Thr Val

5

10

ES 2 682 520 T3

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

Asp Ser Asp Asn Ser Gly Thr His Ala Glu Cys Val Thr Asn Asn Ile
305 310 315 320

Asp Ala Ala Phe Ala Pro Leu Ala Thr Trp Leu Arg Ala Asn Gly Arg
325 330 335

Gln Ala Ile Leu Ser Glu Thr Gly Gly Gly Asn Thr Ala Ser Cys Gln
340 345 350

Thr Tyr Leu Cys Gln Gln Val Ala Tyr Leu Asn Ala Asn Ser Asp Val
355 360 365

Tyr Leu Gly Tyr Ile Gly Trp Ser Ala Gly Ser Phe Asp Ser Thr Tyr
370 375 380

Ile Leu Thr Glu Thr Pro Asn Gly Ser Gly Ser Ser Met Thr Asp Gln
385 390 395 400

Ala Leu Val Ala Ala Cys Leu Thr Arg Thr Ser
405 410

<210> 37

<211> 1242

<212> ADN

<213> *Sclerotinia sclerotiorum*

<400> 37

atgaaggtgc caactcctct gtacactatc cttccgctag tatccagcgc cacagcacag	60
ggcgtgcct atgcacagtg tggaggtaaa ggttggaagg gagcaacgac ttgtgttga	120
ggctatgtgt gtacttattc gagtgaatat tattcgcaat gtttaccggg aactgcgact	180
ctaaccactg ttaccagttc gtccaaacca tcaagctcta gtaccaagac ctcatcaagc	240
gcagcttcaa gctcaacggg aaaaacgaaa tatattggca ccaacatcgc gggttttgac	300
tttggtgtga ccacagatgg cacttgcata acctcggaga tctatcctcc gttgagcagc	360
atagccaacc atcccgatgg cctcggccag atgtccact tctcctaaag cacagggcac	420
aatattttcc gcttacctgt cggatggcag tacctcgtca acaacgtttt gggcggcaca	480
cttgattcca acaatttcgc aacctatgat tcacttggtc aggggtgcct ggcaacaggc	540
gcaagttgca tcattgacat ccacaattat gctcgatgga acggtgggat cattggtcag	600
ggcggcccta ctaatgtca attcgtgagc ctttggaactc agttggcaaa taagtacaag	660
gggaatgoga aggtgatttt cggcttgatg aatgagcccc acgacatgcc aaacatcacc	720
acctgggctg cctcagtcca agcagttgta accgcaatcc gccaaagctgg tgctacgtcg	780
accacgcttc tcttgccctg aaatgattac acctctgctg ggtctttcat atccgatggc	840
agtgcagccg cctgtctaa agtcacgaac ccggatggga caatcacgaa tctgattttt	900
gacgtgcaca aatacttgga ctcagacaac tccggtacta atcttgaatg tgtgacaaat	960
aacattgaca ccgcctttgc accgcttgcc acttggtctc gagcaaacgg acgccaggct	1020
atcctgacag aaaccggtgg tggcaacgtt gcttccctgc agacatattt gtgccaggaa	1080
gttgcttata tcaacgcaa ctcagatgtc tatcttggct atgttggttg ggctgccgga	1140
tcatttgata cgaattatac actgacggaa acaccgaatg gcagtgggtc atcaatgacg	1200
gaccaaccat tggtcgcggc ttgtctaact agatogaatt ag	1242

<210> 38

<211> 413

5 <212> PRT

<213> *Sclerotinia sclerotiorum*

<400> 38

ES 2 682 520 T3

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

Leu Ala Thr Gly Ala Ser Cys Ile Ile Asp Ile His Asn Tyr Ala Arg
 180 185 190
 Trp Asn Gly Gly Ile Ile Gly Gln Gly Gly Pro Thr Asn Ala Gln Phe
 195 200 205
 Val Ser Leu Trp Thr Gln Leu Ala Asn Lys Tyr Lys Gly Asn Ala Lys
 210 215 220
 Val Ile Phe Gly Leu Met Asn Glu Pro His Asp Met Pro Asn Ile Thr
 225 230 235 240
 Thr Trp Ala Ala Ser Val Gln Ala Val Val Thr Ala Ile Arg Gln Ala
 245 250 255
 Gly Ala Thr Ser Thr Thr Leu Leu Leu Pro Gly Asn Asp Tyr Thr Ser
 260 265 270
 Ala Gly Ser Phe Ile Ser Asp Gly Ser Ala Ala Ala Leu Ser Lys Val
 275 280 285
 Thr Asn Pro Asp Gly Thr Ile Thr Asn Leu Ile Phe Asp Val His Lys
 290 295 300
 Tyr Leu Asp Ser Asp Asn Ser Gly Thr Asn Leu Glu Cys Val Thr Asn
 305 310 315 320
 Asn Ile Asp Thr Ala Phe Ala Pro Leu Ala Thr Trp Leu Arg Ala Asn
 325 330 335
 Gly Arg Gln Ala Ile Leu Thr Glu Thr Gly Gly Gly Asn Val Ala Ser
 340 345 350
 Cys Glu Thr Tyr Leu Cys Gln Glu Val Ala Tyr Leu Asn Ala Asn Ser
 355 360 365
 Asp Val Tyr Leu Gly Tyr Val Gly Trp Ala Ala Gly Ser Phe Asp Thr
 370 375 380
 Asn Tyr Thr Leu Thr Glu Thr Pro Asn Gly Ser Gly Ser Ser Met Thr
 385 390 395 400
 Asp Gln Pro Leu Val Ala Ala Cys Leu Thr Arg Ser Asn
 405 410

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido aislado o purificado **caracterizado por que** tiene una actividad endoglucanasa mejorada con respecto a la actividad endoglucanasa de la proteína de referencia EG2, dicho polipéptido se selecciona entre el grupo que consiste en:
 - i) una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 14 SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32 y SEQ ID NO: 34;
 - ii) una secuencia de aminoácidos que presenta un porcentaje de identidad de al menos 98 %, preferentemente 99 %, con respecto a la secuencia SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 34.
2. Ácido nucleico purificado o aislado, **caracterizado por que** codifica al menos un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1.
3. Ácido nucleico purificado o aislado de acuerdo con la reivindicación 2 seleccionado entre las siguientes secuencias: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 33.
4. Vector **caracterizado por que** comprende un ácido nucleico de acuerdo con una de las reivindicaciones 2 o 3.
5. Célula huésped aislada **caracterizada por que** comprende el ácido nucleico de acuerdo con una de las reivindicaciones 2 o 3 o el vector de acuerdo con la reivindicación 4.
6. Célula huésped aislada de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizada por que** se selecciona entre *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Neurospora*, *Humicola*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Thermomonospora*, *Myceliophthora*, *Chrysosporium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Streptomyces*, *Yarrowia*, *Pichia* y *Saccharomyces*.
7. Célula huésped aislada de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, **caracterizada por que** se selecciona entre *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viridae*, *Trichoderma koningii*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus wentii*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus phoenicis*, *Neurospora crassa*, *Humicola griseae*, *Myceliophthora thermopila*, *Chrysosporium lucknowense*, *Penicillium pinophilum*, *Penicillium oxalicum*, *Escherichia coli*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium saccharolyticum*, *Clostridium benjerinckii*, *Clostridium butylicum*, *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica* y *Saccharomyces cerevisiae*.
8. Uso de dicho polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 para la hidrólisis de celulosa.
9. Uso de dicho polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 para la producción de biocombustible.
10. Composición enzimática capaz de actuar sobre la biomasa lignocelulósica que comprende al menos un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1.
11. Procedimiento de producción de biocombustible a partir de biomasa, **caracterizado por que** comprende las siguientes etapas sucesivas:
 - poner en suspensión en fase acuosa la biomasa que se va a hidrolizar;
 - hidrólisis en presencia de una composición enzimática de acuerdo con la reivindicación 10 de la biomasa lignocelulósica a fin de producir un hidrolizado que contiene glucosa;
 - fermentación de la glucosa del hidrolizado a fin de producir un mosto de fermentación;
 - separación del biocombustible del mosto de fermentación.
12. Procedimiento de producción de biocombustible a partir de biomasa, **caracterizado por que** comprende las siguientes etapas sucesivas:
 - poner en suspensión en fase acuosa la biomasa que se va a hidrolizar;
 - adición simultánea de una composición enzimática de acuerdo con la reivindicación 10 y de un organismo fermentativo a fin de producir un mosto de fermentación;
 - separación del biocombustible del mosto de fermentación.
13. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el organismo fermentativo se selecciona entre una célula huésped de acuerdo con una de las reivindicaciones 6 o 7.
14. Procedimiento de producción de biocombustible a partir de biomasa, **caracterizado por que** comprende las

siguientes etapas sucesivas:

- poner en suspensión en fase acuosa la biomasa que se va a hidrolizar;
 - adición de una o más células huésped de acuerdo con una de las reivindicaciones 5 a 7 con un organismo fermentativo y/o una composición enzimática de acuerdo con la reivindicación 10, a fin de producir un mosto de fermentación;
 - separación del biocombustible del mosto de fermentación.
- 5

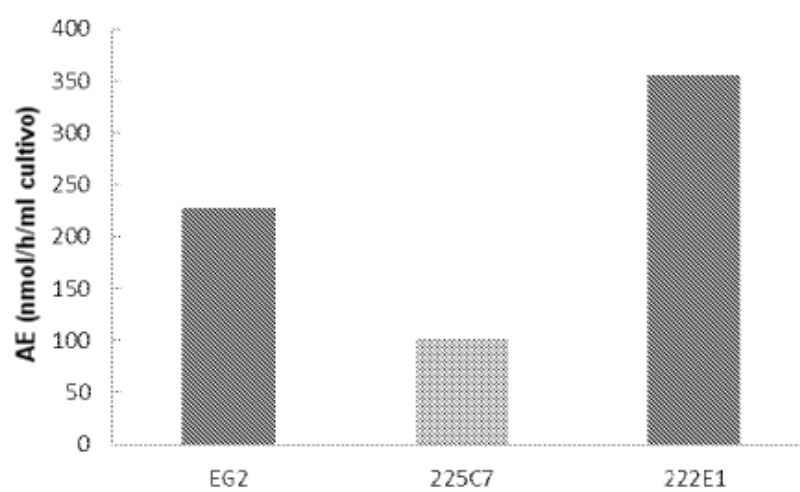


FIGURA 1

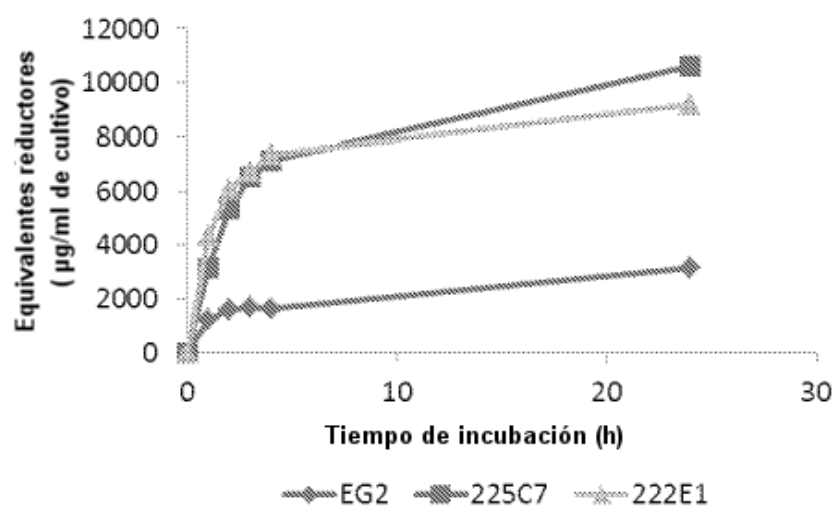


FIGURA 2

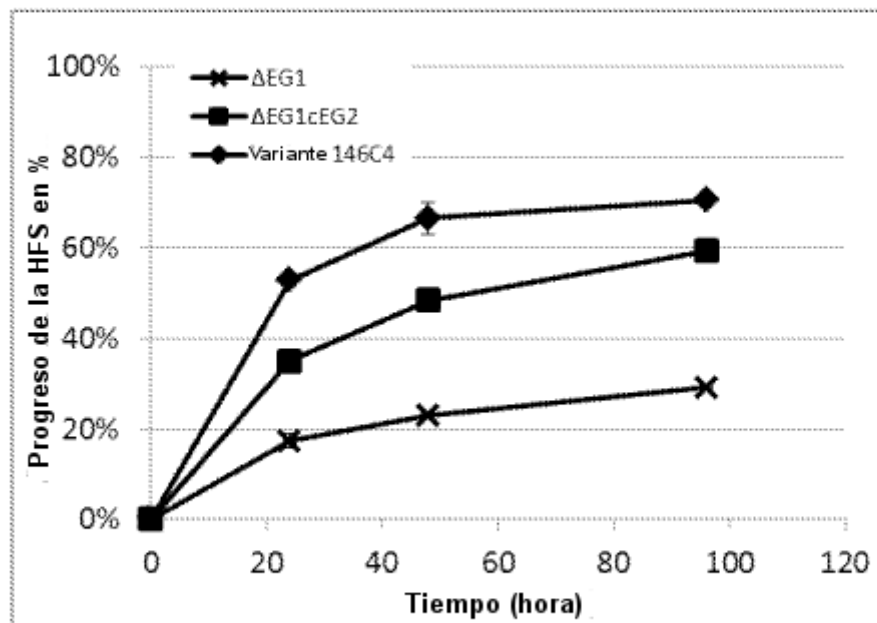


FIGURA 3

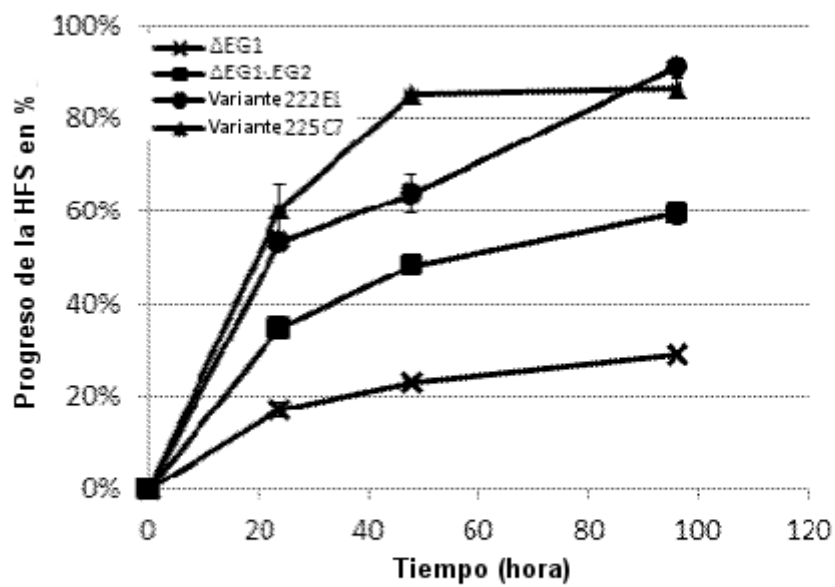


FIGURA 4

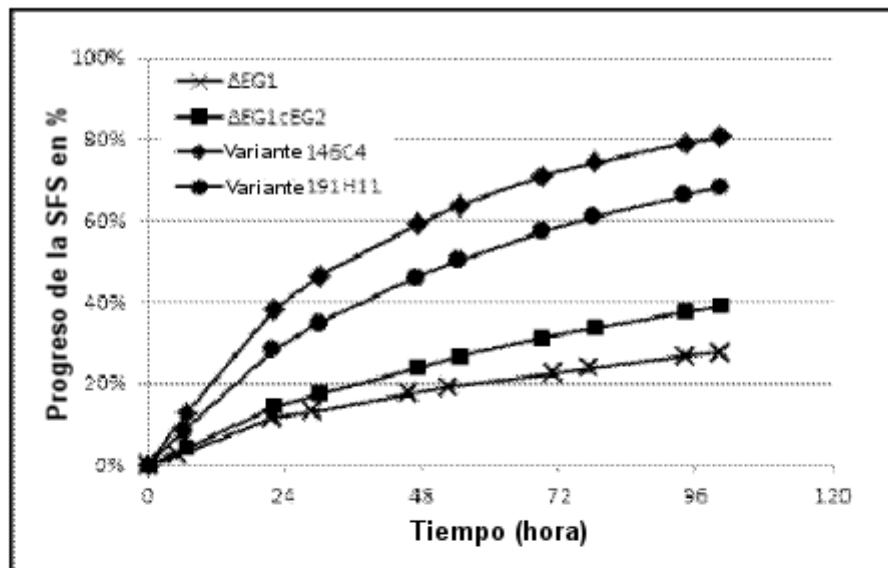


FIGURA 5

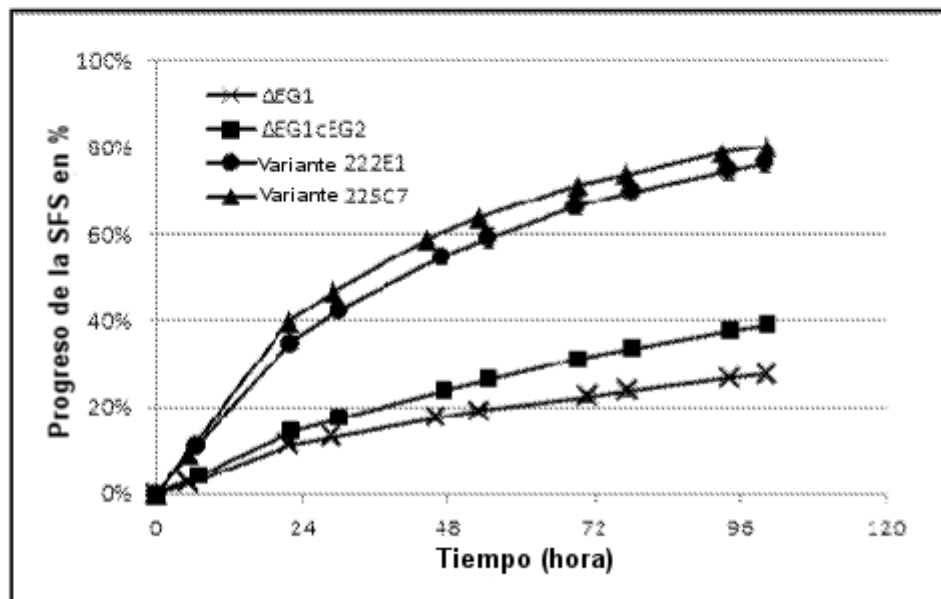


FIGURA 6